



HAL
open science

Dispositif électro-optique à base de cristaux liquides pour la détection de l'activité neuronale in vitro

Tiphaine Belloir

► **To cite this version:**

Tiphaine Belloir. Dispositif électro-optique à base de cristaux liquides pour la détection de l'activité neuronale in vitro. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAT122 . tel-03917101

HAL Id: tel-03917101

<https://theses.hal.science/tel-03917101v1>

Submitted on 1 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **NANO ELECTRONIQUE ET NANO TECHNOLOGIES**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Tiphaine BELLOIR

Thèse dirigée par **Jumana BOUSSEY**, Directeur de recherche,
CNRS

Préparée au sein du **Laboratoire des Technologies de la
Microélectronique**
dans l'**École Doctorale Electronique, Electrotechnique,
Automatique, Traitement du Signal (EEATS)**

Dispositif électro-optique à base de cristaux liquides pour la détection de l'activité neuronale *in vitro*

Liquid crystal based electro-optical device for large scale *in vitro* neural activity monitoring

Thèse soutenue publiquement le **29 octobre 2018**,
devant le jury composé de :

M. Skandar Basrou

Professeur UGA, Laboratoire TIMA, Grenoble, Président du jury

Mme Catherine Villard

Directrice de recherche CNRS, Institut Curie, Paris, Rapporteur

M. Benoît Charlot

Chargé de recherche CNRS, IES Montpellier, Rapporteur

Mme Jumana Bousse

Directrice de recherche CNRS, LTM, Grenoble, Directrice de thèse



Table des matières

Introduction	4
Chapitre 1 Réseaux de neurones in vitro	6
I. Organisation et activité neuronale	6
II. Modèles d'étude <i>in vitro</i> pour les neurosciences	10
III. Systèmes de mesure de l'activité <i>in vitro</i>	13
A. Electrophysiologie traditionnelle : le patch clamp.....	13
B. L'imagerie calcique.....	14
C. Les réseaux de microélectrodes (MEA).....	15
D. Les réseaux de transistor à effet de champ.....	17
IV. Approche et objectifs	20
Chapitre 2 La transduction électro-optique des cristaux liquides	22
I. Généralités sur les cristaux liquides et leurs applications à la visualisation	22
A. Propriétés physiques.....	24
B. Techniques d'affichage exploitant les propriétés des cristaux liquides.....	27
C. Principe des afficheurs à cristaux liquides.....	34
II. Cristaux liquides pour la détection de signaux neuronaux.	39
A. Principe général et spécifications du dispositif	39
B. Caractéristiques de détection du dispositif	42
C. Modèle électrique équivalent du neurone couplé au transducteur.....	48
III. Fabrication de la cellule à cristaux liquides	56
A. L'alignement des cristaux liquides	57
B. Espaceurs.....	61
C. Assemblage.....	63
D. Etude de fonctionnement	65
Conclusion du Chapitre 2	67
Chapitre 3 Interface Neurones/Cristaux liquides	70
I. Cahier des charges de l'interface neurones/cristaux liquides	70
II. Interface composite	71
A. Polymère conducteur dans une matrice isolante	72

B. Nanofils de Silicium encapsulés dans une matrice isolante	81
III. Interface homogène	88
C. Choix du diélectrique : le nitrure de silicium	89
D. Libération des membranes : approche conventionnelle.....	90
E. Optimisation du procédé de fabrication des membranes : usage de la gravure laser	93
Conclusion du Chapitre 3	100
Chapitre 4 Assemblage et caractérisations du dispositif	102
I. Étude du dispositif final.....	102
A. Fabrication : assemblage des différents éléments	102
B. Banc de caractérisation	105
C. Caractérisations optiques.....	107
D. Caractérisations électro-optiques fonctionnelles.....	111
II. Neurone artificiel	118
A. Présentation de la plateforme microfluidique	118
B. Simulation par CFD (<i>Computational fluid dynamics</i>)	122
C. Fabrication.....	129
D. Caractérisations morphologiques.....	132
E. Caractérisation fonctionnelle	134
III. Vers le couplage du dispositif avec les cellules neuronales	138
A. Culture de neurones primaires d'hippocampe.....	139
B. Maintien des cultures à long terme	142
C. Viabilité des neurones sur le nitrure de silicium.....	145
Conclusion du chapitre 4.....	149
Conclusion générale et perspectives.....	152
Bibliographie.....	158

Introduction

Le système nerveux est un ensemble complexe de cellules connectées en réseaux, chargé de la coordination de l'ensemble des fonctions assurées par les organes d'un être vivant. Les mécanismes de son fonctionnement ou de ses affections, aussi bien à l'échelle cellulaire qu'au niveau de l'organisme entier restent encore mal connus à ce jour.

Accéder à l'activité des neurones, ces cellules élémentaires du système nerveux porteuses de l'information, est un réel enjeu des neurosciences aujourd'hui pour mieux comprendre le fonctionnement du cerveau et du système nerveux central en général. Des projets d'envergure internationale comme le *Human Brain Project* en Europe, ou le *BRAIN initiative* aux USA ont été créés dans le but de promouvoir le développement de nouvelles technologies, modèles théoriques ou méthodes computationnelles capable d'aider à la compréhension fondamentale du fonctionnement du cerveau, et de ses affections neurodégénératives comme la maladie D'Alzheimer, de Parkinson ou celle d'Huntington. L'un des objectifs avérés de ces projets est de cartographier en détail l'activité cérébrale, que ce soit à l'échelle d'un neurone unique ou d'une région entière. La complexité et la quantité massive d'informations à analyser limite l'étude et la compréhension de la structure du cerveau et de son activité fonctionnelle. C'est pourquoi les progrès technologiques ont également permis l'émergence de modèles permettant de recréer *in vitro* des réseaux minimalistes contrôlés capables de reproduire la structure de leurs homologues *in vivo*. Ces modèles sont de vrais laboratoires sur puces, permettant d'étudier des processus fondamentaux, de simuler une maladie ou encore de tester des médicaments.

Enregistrer l'activité individuelle des neurones sur l'ensemble d'un tel réseau *in vitro* est un réel défi pour accéder à leur fonction. Les techniques actuelles d'enregistrement *in vitro* (électrophysiologie, imagerie calcique ou encore MEA Micro Electrode Array) souffrent d'un compromis systématique entre la résolution et la quantité de neurones détectables simultanément (i.e. le champ d'observation).

L'objectif de cette thèse est de lever cette contrainte en développant une nouvelle technique d'enregistrement de l'activité neuronale *in vitro*. L'approche proposée consiste à interfacer les neurones en culture *in vitro* à un transducteur électro-optique novateur à base de cristaux liquides, capable de convertir les signaux électriques issus de l'activité neuronale en variation d'intensité optique. Couplé à un capteur imageur adapté (sans lentille de type CMOS, d'une surface de quelques cm² contenant plusieurs millions de pixels, avec une résolution subcellulaire de l'ordre du μm^2), ce dispositif devrait permettre l'enregistrement de l'activité neuronale d'un réseau complexe (plusieurs millions de neurones) de manière non invasive (aucun marquage n'est requis), et à la résolution du neurone unique.

Le Chapitre 1 de ce manuscrit introduit dans un premier temps les concepts de la signalisation neuronale et des processus impliqués dans l'activité électrique des neurones. L'importance des modèles d'études *in vitro* et de l'intérêt d'accéder à leur fonction sera ensuite soulignée. Un état de l'art des techniques d'enregistrement existantes est donné, présentant les avantages et les limitations de chacune d'elles. Enfin, les principaux objectifs de ces travaux de thèse sont énoncés.

Le Chapitre 2 présente une étude théorique du concept imaginé, confrontant directement les caractéristiques de la grandeur à mesurer (les signaux neuronaux) aux propriétés physiques du dispositif complet (transducteur à cristaux liquide + capteur optique.) Un modèle basé sur un circuit

électrique équivalent explicitant le comportement des différents éléments du dispositif et de leurs interactions mutuelles a été présenté.

Le Chapitre 3 retrace les très nombreuses explorations technologiques ayant visé à mettre au point la couche interfaciale chargée de transmettre les signaux neuronaux aux cristaux liquides, élément clé du dispositif.

Le chapitre 4 détaille la fabrication d'un premier prototype de transducteur complet en passant en revue les procédés de fabrication de tous les sous-systèmes de ce prototype et en décrivant également leur assemblage. Les caractérisations optiques et électro-optiques de ce prototype ont été conduites et analysées en détails dans ce chapitre et discutées au regard des objectifs initiaux. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous décrivons les tentatives de caractérisations fonctionnelles que nous avons menées. La première a consisté à développer, en l'absence de neurones biologiques, un nouvel outil susceptible de simuler les signaux neuronaux et de permettre une étude approfondie du prototype en s'affranchissant des contraintes inhérentes à la culture neuronale. Pour cela, une puce microfluidique munie d'une fonction de confinement hydrodynamique de flux a été conçue, réalisée et sa caractérisation entamée. Enfin la compatibilité des matériaux constitutifs de ce prototype amenés à être en contact avec les neurones biologiques a été évaluée.

Compte tenu de la forte composante technologique et de l'ampleur du projet, nous avons été à cours de temps et de moyens matériels pour tout réaliser. Aussi, nous avons clôturé cette thèse en ayant ouvert des pistes d'investigation, d'optimisation et de validation qui restent à explorer. Les dernières pages de ce manuscrit ont été consacrées à proposer des perspectives qui nous semblent pertinentes à conduire.

Chapitre 1

Réseaux de neurones in vitro

Dans ce chapitre, nous introduisons dans un premier temps les concepts de la signalisation neuronale et des processus impliqués dans l'activité électrique des neurones. L'importance des modèles d'études in vitro et de l'intérêt d'accéder à leur fonction sera ensuite soulignée. Un état de l'art des techniques d'enregistrement existantes est donné, présentant les avantages et les limitations de chacune d'elles. Enfin, les principaux objectifs de ces travaux de thèse sont énoncés.

I. Organisation et activité neuronale

Chez les êtres vivants, le système nerveux est chargé du contrôle et de la coordination de tous les éléments composants un organisme, en réalisant des fonctions allant de l'acquisition de signaux sensoriels, à la production d'une réponse motrice par exemple. Ce système complexe est divisé en deux parties : le système nerveux central (CNS pour *Central Nervous System*), lui-même composé du cerveau et de la moelle épinière, et du système nerveux périphérique (PNS *Peripheral Nervous System*), essentiellement composé de neurones sensoriels et de nerfs, connectés au CNS. Dans la suite de ce manuscrit nous traiterons essentiellement du cerveau, pôle central du système nerveux, et des cellules élémentaires qui le composent et qui assurent le support de l'information : les neurones.

Chez l'être humain, le cerveau est composé de plus de 100 milliards de neurones regroupés en différentes zones fonctionnelles possédant chacune une architecture propre à sa fonction biologique [1]. Cette organisation se retrouve chez d'autres mammifères, notamment chez le rat, comme c'est illustré Figure 1. Le développement de chacune des régions diffère selon les besoins et les caractéristiques de l'espèce. Par exemple le bulbe olfactif est très développé chez le rat, alors que chez l'être humain, c'est le cortex qui est prédominant.

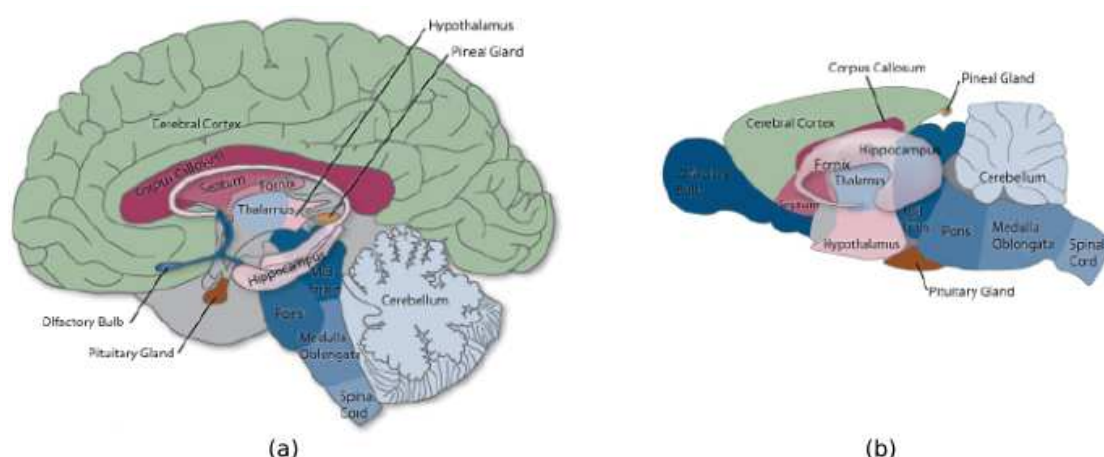


Figure 1 Exemple de l'organisation cérébrale en différentes aires fonctionnelle, chez l'être humain (a) et chez le rat (b). On retrouve les mêmes régions, plus ou moins développées selon les besoins et caractéristiques de l'espèce. Adapté de [2].

Comprendre comment l'organisation particulière des différentes zones du cerveau permet d'effectuer des tâches différentes est actuellement un défi majeur dans le monde des neurosciences. Une des caractéristiques bien connues des réseaux de neurone est leur plasticité, c'est-à-dire, le fait qu'ils évoluent constamment en fonction même de leur activité. Les connexions peuvent se renforcer ou au

contraire disparaître, et de nouvelles connexions peuvent être créées. Il existe différentes morphologies et géométries de neurones selon les différentes zones fonctionnelles du cerveau. Par exemple, l'hippocampe, que nous serons amenés à manipuler, est constitué majoritairement de cellules neuronales pyramidales, qui confèrent à cette région une architecture triangulaire très particulière. L'hippocampe est responsable entre autre de la mémoire spatiale et de la navigation [3], de la mémoire à long terme [4], et de l'apprentissage [5]. Il a été montré que les principales maladies neurodégénératives étaient à relier, entre autres, à un dysfonctionnement de l'hippocampe. C'est le cas pour la maladie d'Alzheimer par exemple, où la dégénérescence de cellules hippocampales est à l'origine de symptômes tels que la perte de mémoire ou la désorientation, caractéristiques de la maladie[6]. Nous y reviendrons plus en détail dans le chapitre 4 de ce manuscrit.

Au niveau cellulaire, le système nerveux central est composé essentiellement de neurones comme nous l'avons déjà mentionné, mais également de cellules gliales. Ces cellules assurent le support mécanique des neurones, les isolent électriquement entre eux, assurent leur apport en nutriments et façonnent le système immunitaire du cerveau [7][8][9]. Les neurones, quant à eux, sont les cellules électriquement excitables du système nerveux. Ils reçoivent, traitent et transmettent l'information. Bien qu'il existe différentes morphologies de cellules neuronales comme nous l'avons mentionné juste avant, ces cellules présentent une architecture commune, qui consiste en un corps cellulaire, aussi appelé soma et mesurant en moyenne 10 à 20 μm de diamètre et deux types de prolongements : les dendrites et l'axone. Le soma (corps cellulaire) regroupe les différentes organelles (noyau, cytoplasme, mitochondrie, etc.) qui contrôlent le métabolisme et l'ensemble des fonctions de la cellule. Les prolongements peuvent varier de quelques μm à plus d'un mètre de longueur et assurent la propagation des signaux électriques : les potentiels d'action.

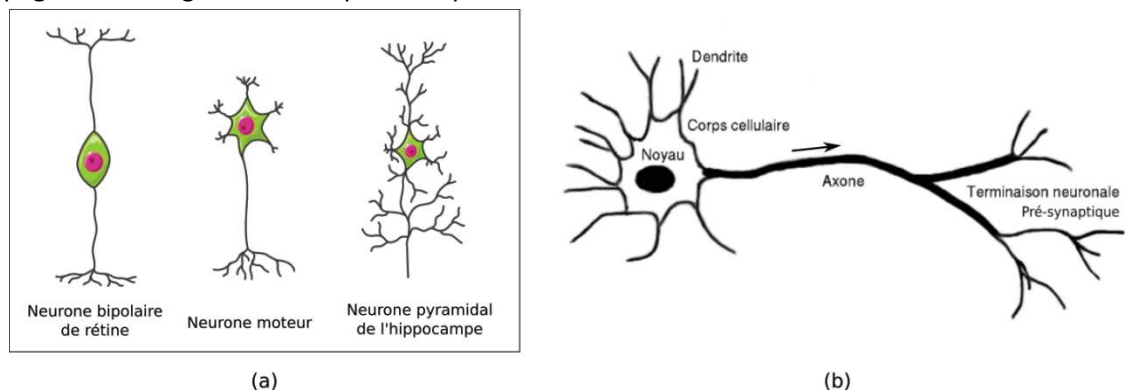


Figure 2 (a) Exemple de différentes géométries de neurones selon différentes régions fonctionnelles du cerveau. (b) Morphologie commune à toutes les cellules neuronales de mammifères comprenant un corps cellulaire contenant le noyau et des prolongements cellulaires appelés neurites englobant les dendrites et l'axone. La flèche indique le sens de propagation des signaux électriques.

Les neurones sont des cellules polarisées du point de vue du traitement de l'information. Le corps cellulaire et les dendrites constituent le pôle récepteur qui reçoit et intègre les signaux provenant des neurones en amont dans le réseau considéré. L'axone est le pôle émetteur qui transmet ces signaux électriques, les potentiels d'action (PA), vers les neurones suivants. L'ensemble des prolongements (dendrites et axone confondus) forment ce qu'on appelle les neurites. La communication entre neurites s'effectue via des jonctions cellulaires, appelées synapses, situées aux extrémités et formant les terminaisons des neurites. Le signal à l'extrémité d'un axone (neurone émetteur) est transmis à une dendrite (neurone récepteur) via la synapse par voie chimique : des neurotransmetteurs sont libérés, et sont reconnus spécifiquement par l'extrémité de la dendrite, générant un signal électrique post synaptique qui continue de se propager.

Activité électrique

Le neurone est une cellule excitable, c'est-à-dire capable d'émettre des potentiels d'action grâce à la présence sur sa membrane de canaux ioniques voltage-dépendants. Comme toute cellule son cytoplasme possède un potentiel de repos d'environ -70 mV par rapport au potentiel extracellulaire, établi et maintenu par des protéines transmembranaires appelées pompes ioniques qui induisent des différences de concentrations de part et d'autre de la membrane par des flux d'ion sodium Na^+ et potassium K^+ notamment.

Ce potentiel peut varier sous l'effet de multiples facteurs (activation de neurotransmetteurs due à la réception spécifique d'un stimulus extérieur, ouverture spontanée de canaux ioniques, etc.) et un phénomène de dépolarisation brutal peut intervenir si le potentiel membranaire dépasse un seuil d'environ -55 mV. L'ouverture simultanée des canaux voltage-dépendants sodique (Na^+) entraîne une variation rapide du potentiel membranaire local de l'ordre de 100 mV appelée dépolarisation, causée par un flux d'ions sodium entrant dans la cellule. C'est le pic du potentiel d'action. Cette dépolarisation est suivie d'un retour progressif à l'équilibre initial grâce à l'ouverture des canaux potassique (K^+) qui permet la sortie d'ions potassium vers le milieu extracellulaire c'est la repolarisation. Les canaux potassiques laissent sortir plus de potassium que ce qu'il n'est rentré de sodium dans la cellule ; on voit alors apparaître un phénomène d'hyperpolarisation avant un retour complet au potentiel de repos. L'ensemble de ce processus que l'on appelle potentiel d'action et qui dure d'1 à 2 ms est illustré Figure 3 (a), (b).

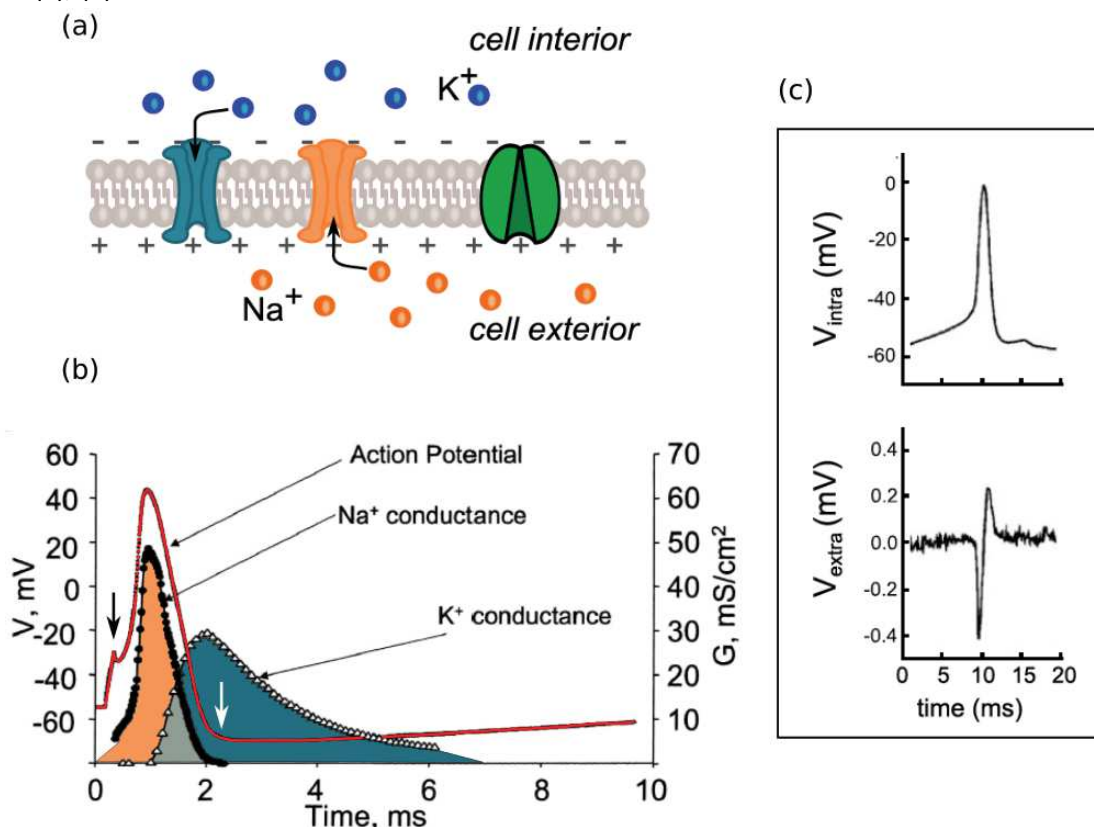


Figure 3 Activité électrique neuronale et échanges ioniques membranaires associés. (a) Schéma en coupe de la membrane d'un neurone comprenant les canaux ioniques voltage-dépendant de potassium K^+ (bleu) et de sodium Na^+ (orange) ainsi que la pompe ionique (vert). (b) Évolution du potentiel membranaire et de la conductance des canaux ioniques lors du passage d'un potentiel d'action. Une fois le seuil du potentiel de repos dépassé, les canaux ioniques s'ouvrent laissant rentrer un flux d'ions Na^+ à l'intérieur de la cellule, et sortir un flux d'ions K^+ . Ces flux ioniques causent une dépolarisation transmembranaire correspondant au pic du potentiel d'action. La pompe ionique s'active ensuite pour rétablir les concentrations initiales de Na^+ et de K^+ . La flèche noire indique la tension seuil et la flèche blanche indique l'hyperpolarisation. Adapté de [10]. (c) Exemple de l'allure d'un potentiel d'action mesuré de deux façon différentes: le

premier (haut) en intracellulaire avec une micropipette de patch clamp, le second (bas) en extracellulaire avec à transistor à effet de champ Si-FET interfacé à l'axone du neurone, adapté de [11] et [12].

Cette variation brutale et locale du potentiel membranaire se propage alors de proche en proche à une vitesse d'environ 1 m.s^{-1} le long de la membrane cellulaire, la dépolarisation en un point donné entraînant le dépassement du seuil et donc l'ouverture des canaux voltage-dépendants à proximité. Le codage de l'information transmise est caractérisé par son aspect fréquentiel, les signaux étant émis sous forme de « *burst* » de potentiels d'action, l'amplitude des signaux reste quant à elle relativement constante. Pour des cellules neuronales de mammifères, les potentiels d'actions enregistré en intracellulaire (à l'aide d'une micropipette de patch-clamp, méthode qui sera décrite par la suite) ont une amplitude comprise entre 10mV et 100mV. (Figure 3 (c)). Lorsqu'ils sont mesurés en extracellulaire (enregistrés à l'extérieur à proximité de la cellule) ils présentent une amplitude typiquement comprise entre 100 et 500 μV , avec des pics occasionnels atteignant 1mV [13][14].

Du potentiel d'action aux oscillations collectives

In vivo, donc à l'échelle d'un cerveau entier, ces signaux affichent différentes formes et caractéristiques selon la position de l'électrode utilisée pour les détecter. La contribution de l'activité individuelle de chaque neurone peut se superposer à certains endroits du milieu extracellulaire résultant en une différence de potentiel entre cet endroit et un potentiel de référence. Ce gradient de potentiel est à l'origine d'un champ électrique, qui peut être détectable par des électrodes placées à l'extérieur. Selon la localisation de cette électrode, les potentiels enregistrés sont soit des EEG (électroencéphalogramme) lorsque l'électrode est placée sur le crâne, soit des ECoG, (électrocorticogramme) lorsqu'elle est placée sous le crane directement sur la surface corticale, soit des LFP (*Local field potentials*, ou potentiels de champ locaux) lorsque l'enregistrement est effectué avec des électrodes pénétrant le cerveau [15]. Les potentiels de champ locaux LFP résultent de la superposition de tous les phénomènes d'échanges ioniques ayant lieu au niveau cellulaire, incluant notamment les potentiels d'action, l'activité synaptique et les interactions neurones-cellules gliales. Les caractéristiques de ces oscillations collectives détectées dépendent de la contribution des différentes sources, des propriétés cérébrales de la zone sondée ainsi que de la distance par rapport à l'électrode, l'amplitude du potentiel décroissant de manière inversement proportionnelle avec la distance [16].

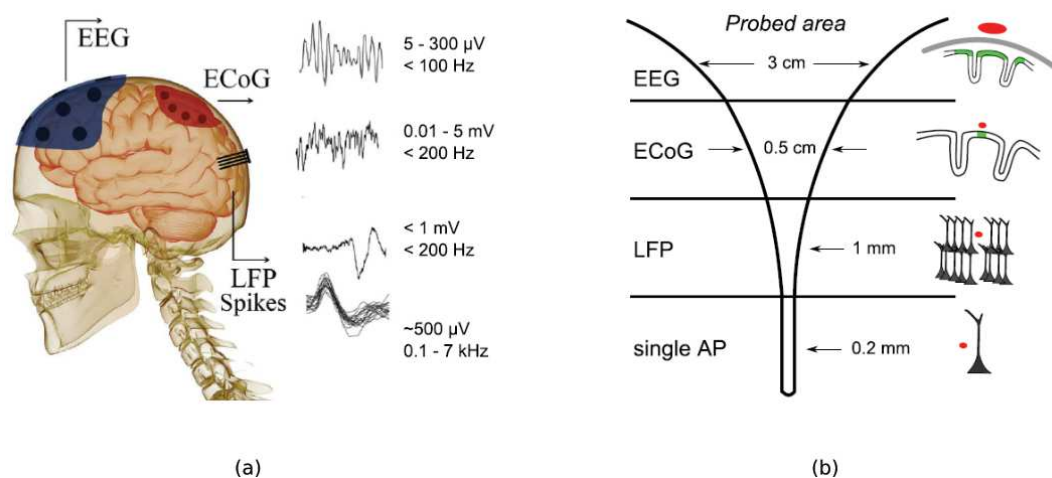


Figure 4 Enregistrement de l'activité électrique neuronale in vivo. (a) Schéma illustrant le positionnement des électrodes et les caractéristiques des signaux détectés correspondantes. Adapté de [17]. (b) Résolution spatiale des différentes techniques utilisées. Adapté de [18].

Nous verrons que dans le cadre d'études *in vitro* dans lequel nous nous placerons, qui correspond à une échelle de quelques neurones à plusieurs milliers de neurones en réseaux 2D, les signaux enregistrés en extracellulaire sont de type potentiel d'action (100 μ V-500 μ V, 0,1KHZ-7KHZ) et potentiels de champ locaux (<1mV,200Hz). Ce sont ces signaux que nous serons amenés à enregistrer par la suite dans le cadre de ces travaux. Nous passerons en revue les différentes techniques existantes utilisées pour l'enregistrement de l'activité neuronale *in vitro* en détaillant leurs avantages mais aussi les limitations ayant motivées ce projet. Nous allons au préalable expliquer plus en détail le contexte et les raisons motivant l'utilisation de modèle *in vitro* pour l'étude et la compréhension des mécanismes cérébraux.

Conclusion de la partie I

Les cellules neuronales sont connectées en réseau et assurent l'ensemble des fonctions du système nerveux via la propagation de signaux électriques rapides. Des flux d'ions transmembranaires créant une dépolarisation locale de la membrane qui se propage sont à l'origine de cette activité électrique. Pour des neurones cultivés *in vitro*, ces signaux peuvent être détectés en pénétrant directement la cellule (on parle alors d'enregistrement intracellulaire) dans ce cas les signaux ont une amplitude d'environ 100mV. Ces signaux peuvent également être détectés à l'extérieure à proximité de la cellule, ils ont alors une amplitude comprise entre 100 μ V et 500 μ V, et une fréquence allant de 0,1KHz à 7KHz. La superposition de plusieurs phénomènes d'échanges ioniques ayant lieu au niveau cellulaire peut générer une autre forme de signaux également détectables à proximité de la cellule, les potentiels de champ locaux LFP. Ces signaux ont alors une amplitude de quelques centaines de μ V, voir quelques mV, en une fréquence de l'ordre de la centaine de HZ.

II. Modèles d'étude *in vitro* pour les neurosciences

Pour étudier et mieux comprendre les processus fondamentaux qui régissent le stockage et le traitement de l'information, il est impératif de pouvoir accéder à l'activité du cerveau. Les techniques existantes de détection de l'activité cérébrale *in vivo* comme les EEG, ECoG, mais également l'IRMf (Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle) ou encore la TEP (Tomographie par émission de positrons) sont des outils d'une grande praticité permettant d'accéder à l'activité d'un cerveau entier, ou à celle de certaines régions responsables de différentes fonctions et ont également aidé à progresser dans la compréhension de certaines pathologies neurologiques. Cependant pour la plupart de ces techniques, les signaux détectés correspondent à la superposition de l'activité de vastes zones neuronales et présentent une faible densité d'information. De plus ce sont souvent uniquement les zones périphériques du cerveau près de la surface du crâne qui sont sondées.

Des électrodes implantées (de type *Utah array* ou *Michigan array*) pénétrant le tissu cérébral peuvent être utilisées pour accéder à des zones plus profondes ou augmenter la résolution spatiale et temporelle des signaux détectés, au détriment de la quantité de neurones sondés [19]. Cependant là aussi et malgré la petite taille des électrodes utilisées, plusieurs neurones peuvent être à l'origine de l'activité détectée. Ces électrodes permettent d'accéder à des zones très localisées et profondes comme le cortex visuel ou moteur [20] mais leur utilisation est très limitée en raison de leur nature invasive.

Par ailleurs, la grande complexité des connectivités due à la structure tridimensionnelle du cerveau et la quantité d'informations traitées rendent les études *in vivo* très difficiles et les techniques utilisées pas toujours pertinentes. Pour faciliter le cadre des études entreprises il est nécessaire de disposer de

modèles simplifiés reproduisant de façon pertinente des réseaux de neurones *in vitro*, dont la structure peut aller de quelques cellules pour des réseaux simples à des réseaux complexes de plusieurs milliers de neurones, et pouvant faire intervenir des neurones de plusieurs populations. Certains emploient même aujourd'hui le terme « *Brain on chip* », traduisant littéralement le concept de cerveau sur puce [21].

Outre le besoin de reproduire la structure et la géométrie de manière précise et contrôlée, ces modèles *in vitro* nécessitent également d'accéder aux différentes fonctions et activité des cellules en jeu, que ce soit à l'échelle moléculaire (connexions et transmission synaptique) cellulaire (signaux post synaptiques) ou à l'échelle de réseaux entiers (connectivité). La Figure 5 illustre une plateforme microfluidique reproduisant la structure d'une boucle striato-corticale permettant l'analyse d'un réseau à différentes échelles.

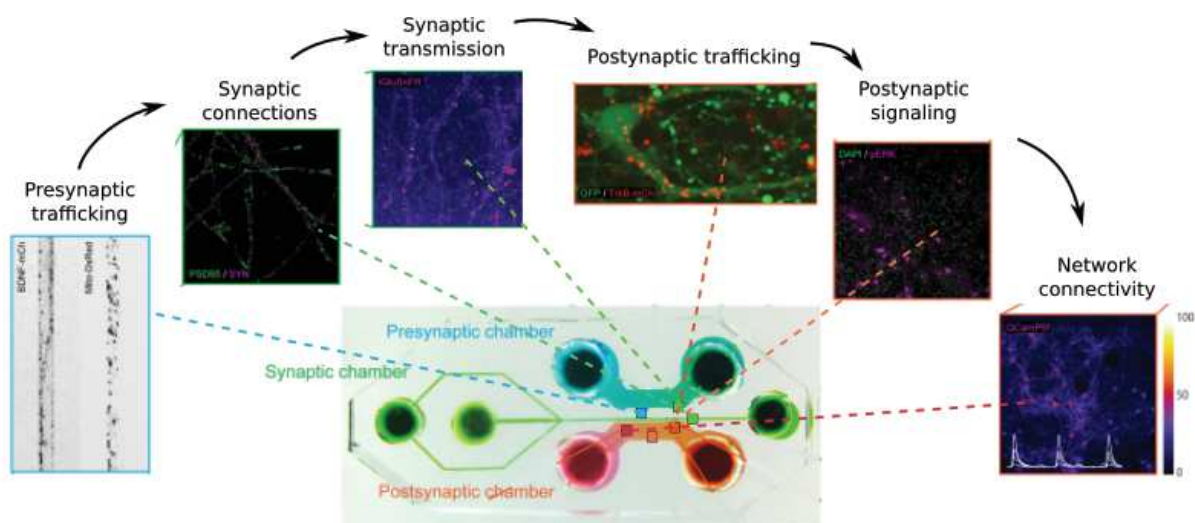


Figure 5 Exemple de modèle *in vitro* permettant une étude multi-échelle des différentes fonctions du réseau créé. Il s'agit ici d'une plateforme microfluidique reproduisant la structure d'une boucle cortico-striatale modélisant les dysfonctionnements de la maladie d'Huntington. Adapté de [22].

Parce qu'ils constituent des plateformes d'études contrôlées, pertinentes et reproductibles, ces circuits *in vitro* plus ou moins complexes ont de nombreuses applications [21][23]. Certaines visent à analyser la structure fonctionnelles des réseaux qu'elles recréent [24][25], ou à étudier l'activité d'une région particulière du cerveau [26]. D'autres par exemple s'intéressent aux mécanismes de la mémoire et de l'apprentissage [27]. De nombreuses études se servent de ces plateformes à bas coût pour effectuer des tests de médicaments ou de substances chimiques [28][29].

Enfin ces systèmes sont de puissants outils pour modéliser des affections cérébrales telles que l'épilepsie [30][31] ou la schizophrénie [29], ou encore les principales maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer [32], de Parkinson [33] ou la maladie d'Huntington [22]. Trois exemples d'applications sont illustrés Figure 6.

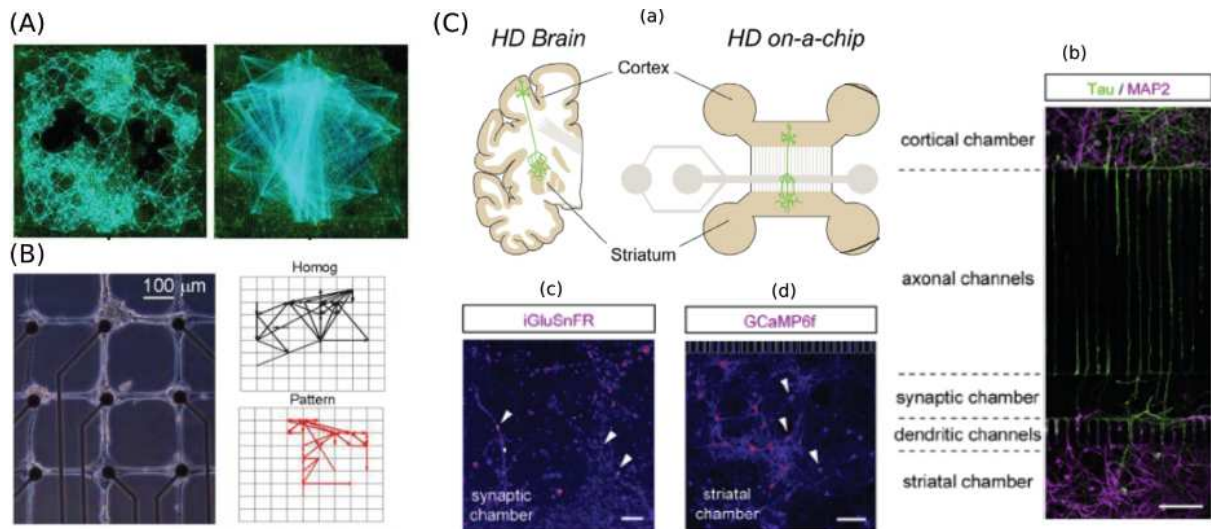


Figure 6 Exemples d'application des modèles in vitro. (A) Etude de la connectivité structurelle (gauche) et fonctionnelle (droite) d'une population de neurones développés sur un réseau de MEA. Adapté de [34]. (B) Comparaison de l'activité entre un réseau homogène (droite, haut) et le réseau structuré (droite, bas) représenté à gauche. Adapté de [35]. (C) Etude de la boucle cortico-striatale caractéristique de la maladie d'Huntington dans une puce microfluidique compartimentée. (a) schéma du design et du principe de la plateforme microfluidique. (b) Marquage des dendrites (en violet) et des axones (en vert) montrant le développement de la structure du réseau dans les différentes chambres. Barre d'échelle 10μm. (c) Glutamate libéré dans la chambre synaptique révélant une activité physiologique correcte. (d) Imagerie calcique dans la chambre striatale montrant une forte activité au sein du réseau. Barres d'échelle 100μm. Adapté de [22].

Ces exemples mettent en avant les deux défis majeurs des études in vitro : la structuration du réseau, et l'étude de sa fonctionnalité.

Structuration et placements des cellules :

Afin de reproduire la structure et la géométrie désirée des réseaux de neurones in vitro, il est nécessaire de pouvoir positionner de manière précise et reproductible les cellules à l'endroit souhaité et en quantité contrôlée. Le positionnement des cellules peut se faire à l'échelle unitaire, ou pour des populations entières de neurones. Il existe aujourd'hui plusieurs méthodes utilisées pour le placement et la croissance contrôlée de réseaux de neurones in vitro [36][37]. Ces méthodes peuvent être classées selon deux approches : la fonctionnalisation et structuration chimique du substrat, ou l'utilisation de microstructures. Pour le placement par fonctionnalisation chimique, les neurones adhèrent et se développent en suivant des motifs de polymères d'adhésion préalablement déposés sur la surface des substrats. Souvent ces polymères d'adhésion sont des polypeptides comme la PLL (Poly-L-lysine) ou la PDL (poly-D-lysine) et agissent en immobilisant les glycoprotéines d'adhésion des neurones [38]. Ils peuvent être structurés par *micro contact printing* [39] ou encore par des méthodes de lithographie classique [40]. Pour accentuer l'effet des motifs d'adhésion, les zones restantes du substrat peuvent être recouvertes de molécules répulsives, comme le PEG (polyéthylène-glycol).

L'alternative à la fonctionnalisation chimique pour contrôler le positionnement des neurones consiste à structurer physiquement le substrat. Certaines approches consistent à créer des cages [41], des micro-piliers [42] ou encore des trous [43] pour piéger et immobiliser les corps cellulaires (Figure 7 (b, c, d)). Une autre technique très répandue consiste à utiliser l'environnement microfluidique [44], comme nous l'avons déjà mentionné. Les neurones en solution sont contenus dans des réservoirs dont la pression est contrôlée, ils sont amenés et déposés dans des chambres via des canaux structurés, souvent dans du PDMS. Ces plateformes microfluidiques permettent non seulement de positionner les cellules, mais aussi selon les géométries utilisées, de contrôler et de guider la croissance et la connectivité des neurites [45], de déposer des neurones de différentes populations et de

compartimenter les cultures [46][47] ou encore de contrôler la densité de neurones déposer [21]. La multifonctionnalité et la structuration des neurones dans ces outils microfluidique est illustré Figure 5 et Figure 6(C). D'autres exemples de structuration des réseaux cités ci-dessus sont illustrés Figure 7. Ces techniques sont plutôt destinées au positionnement individuel ou de quelques cellules, alors que les plateformes microfluidiques permettent la structuration de populations plus importantes.

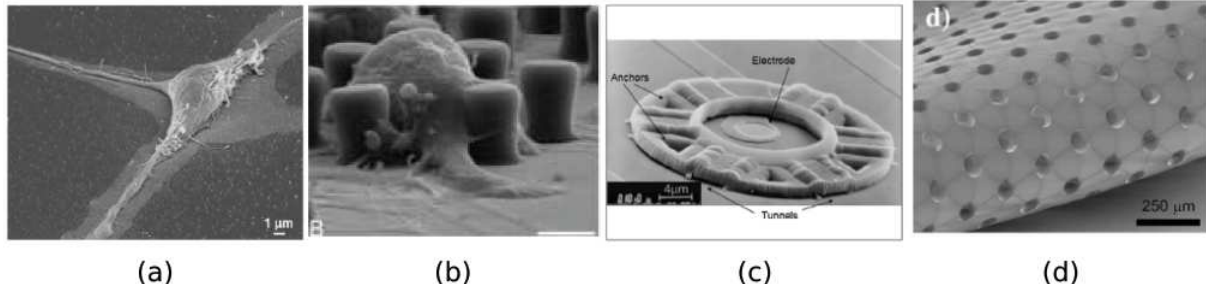


Figure 7 Exemples de placement de neurones in vitro à l'échelle unitaire ou en réseau. (a) Photo MEB d'un neurone adhérant à un motif de PLL [48]. (b) Corps cellulaire d'un neurone piégé entre des piliers [48]. (c) Neurone piégé dans une cage le maintenant sur une électrode [49]. (d) Couche de PDMS structurée d'un réseau de trous interconnectés par des canaux [43].

Conclusion de la partie II

Les réseaux de neurones in vitro représentent de puissants outils pour étudier des comportements neurologiques plus ou moins complexes. Une fois la structure du réseau désirée reproduite grâce aux différentes techniques de placement, le deuxième enjeu des modèles in vitro est d'accéder à leur fonction autrement dit d'enregistrer l'activité électrique des neurones des différentes populations mises en jeu. Dans la prochaine partie, nous allons passer en revue les techniques existantes de détection de l'activité neuronale in vitro.

III. Systèmes de mesure de l'activité in vitro

Il existe plusieurs techniques utilisées par les neuroscientifiques pour accéder à l'activité induite par les cellules neuronales cultivées in vitro [50]. Ces techniques vont de la détection directe des flux d'ions à l'origine même de l'activité neuronale, à l'enregistrement par des électrodes des courants ioniques générés dans le milieu extracellulaire à proximité de la cellule, en passant par l'utilisation de marqueurs ionique fluorescents. Dans la partie suivante, nous allons passer en revue les principales techniques couramment utilisées.

A. Electrophysiologie traditionnelle : le patch clamp.

Nous avons vu précédemment que des mouvements ioniques à travers la membrane du neurone étaient à l'origine de l'activité électrique et donc de la signalisation neuronale. La technique du patch-clamp, mise au point pour la première fois dans les années 1980 [51], permet de mesurer les courants électriques au niveau d'une cellule neuronale ou d'un morceau de membrane. Cette technique consiste à utiliser une micropipette en verre remplie d'une solution électrolytique conductrice dont la composition est proche de celle du milieu intracellulaire pour perforer un morceau de la cellule et ainsi mesurer les flux d'ions circulant à travers la membrane perforée, et d'accéder au potentiel intracellulaire [52]. Dans certaine configuration, la pipette se place en contact avec la membrane sans la perforer, et permet alors de mesurer la conductance des canaux ioniques qu'elle englobe. Selon son diamètre d'ouverture (souvent de l'ordre du μm), le fragment de membrane concerné, isolé du milieu

extracellulaire, peut contenir plus ou moins de canaux ioniques. Des mesures d'un unique canal ionique ont alors pu être conduites, incarnant la plus petite résolution de mesure atteignable [53].

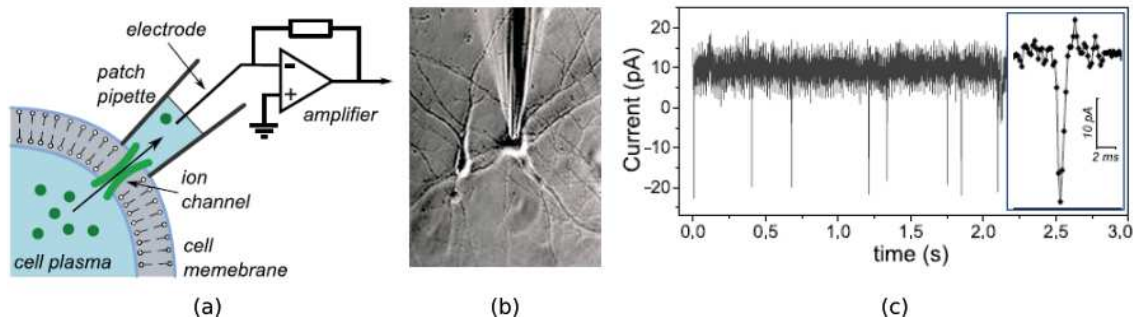


Figure 8 Enregistrement patch-clamp. (a) Principe de fonctionnement pour une configuration de type « on-cell-patch » (la membrane n'est pas perforée). (b) image microscope d'une micropipette au contact d'une cellule. (a) et (b) sont adaptés de [54]. (c) Exemple d'un enregistrement patch clamp de l'activité spontanée d'un neurone d'hippocampe à DIV 21, et agrandissement d'un potentiel d'action. Connaissant l'impédance de l'électrode, on peut ensuite remonter au potentiel membranaire qui est ici de $\sim 75\text{mV}$ [55].

Récompensé du prix Nobel de médecine en 1991, les premiers travaux de patch clamp sur des neurones d'hippocampe apparaissent dès 1992 avec les travaux de Spruston et al [56]. Cette étude décrit les mécanismes de fonctionnement des canaux ioniques d'une cellule en permettant le suivi en direct des phénomènes d'ouverture des canaux.

Le patch clamp permet donc d'accéder au phénomène fondamental à l'origine de l'activité neuronal, à la plus petite résolution possible. Cette technique ne permet cependant pas de paralléliser les mesures à plus de 10 ou 12 cellules, ce qui constitue sa principale limite. De plus, l'introduction de la pipette dans le cytoplasme de la cellule est une approche invasive, qui entraîne dans certaines configurations de patch-clamp la mort de la cellule.

B. L'imagerie calcique

L'imagerie calcique permet, avec l'aide d'indicateurs fluorescents de synthèse, de suivre les variations de concentrations de calcium dans les cellules vivantes. L'ion calcium est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions et activités cellulaires [57],[58]. Il est par exemple impliqué dans la propagation des signaux neuronaux, en particulier dans l'activation de certains canaux potassique déclenchant les potentiels d'action [59], ou dans la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. De plus, les fluctuations de Ca^{2+} dans la cellule (des processus compliqués de régulation du calcium intracellulaire ont lieu en permanence par échange avec le milieu extra cellulaire via des canaux calciques transmembranaires, ou avec des stocks de calcium contenus dans le cytoplasme) modulent l'excitabilité neuronale en influençant le potentiel membranaire. L'ion calcium n'est pas directement impliqué dans la propagation des potentiels d'actions mais joue un rôle secondaire certain dans l'activité électrique des neurones [60].

Par conséquent, les techniques permettant la visualisation ou encore la quantification du calcium intracellulaire se sont énormément développées pour la compréhension de ces mécanismes biologiques. Historiquement, deux facteurs ont permis le développement de cette technique : d'une part la découverte et l'amélioration continue des marqueurs de calcium, et d'autre part le développement des techniques liées à l'instrumentation. Il existe plusieurs types d'indicateurs fluorescents, mais les plus utilisés pour imager le calcium dans les cellules in vitro sont les indicateurs dits chimiques (*chemical calcium indicators*) qui se lient au calcium par chélation (en formant un complexe avec le calcium).

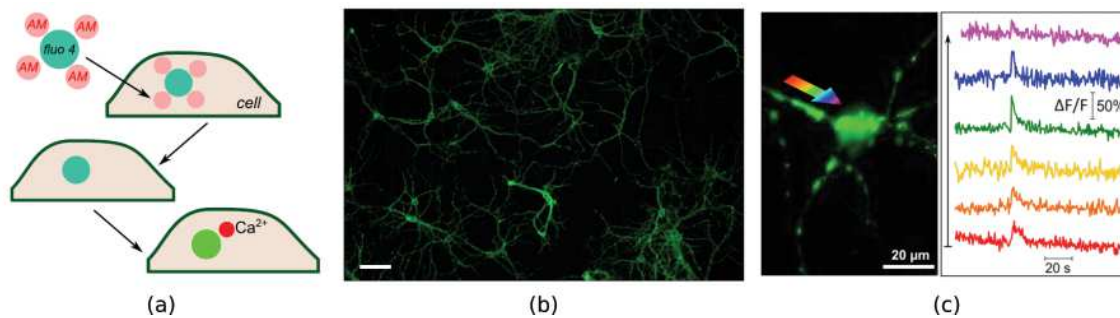


Figure 9 Visualisation de l'activité calcique neuronale. (a) principe du marquage des ions calcium. Ici la sonde Fura-2 est injectée dans les cellules, les groupes ester AM leur permettant de pénétrer la cellule. L'activité estérasiqque dissout ensuite les groupe AM et la sonde se lie aux ions calcium. (b) Image par microscopie de fluorescence permettant de voir la variation de l'activité calcique de plusieurs neurones Barre d'échelle 50μm. (c) Agrandissement sur un neurone dont l'activité a été enregistrée au cours du temps permettant de voir les variation d'intensité de fluorescence en un point donné [61].

Les indicateurs ne sont pas exclusifs ni spécifiques d'un type de neurone, mais seuls certaines sondes comme le fura-2 permettent une analyse quantitative poussée des flux de calcium grâce à leur particularité d'avoir deux longueurs d'onde d'excitation, ce qui permet en les alternant de faire un ratio des signaux obtenus et de remonter à la quantité de calcium. Les autres ne permettent pas de remonter précisément à des concentrations absolues de calcium, mais indiquent les variations relatives de celui-ci au cours du temps. Ce type de marqueur est cependant complexe à utiliser car il requiert une calibration pointue des flux de calcium.

L'imagerie calcique présente une excellente résolution spatiale, permettant d'accéder à l'activité cellulaire voire subcellulaire. Accéder à de telles résolutions se fait cependant au détriment de la quantité de neurones observés, du fait de l'utilisation d'un microscope optique fluorescent. La diffusion ionique étant un processus lent, et les indicateurs calciques difficiles à doser saturant rapidement en intensité ou fournissant un faible rapport signal sur bruit, les performances dynamiques de cette technique s'en trouvent limitées, rendant difficile le suivi de la propagation des signaux neuronaux. Malgré ces inconvénients l'enregistrement de potentiels d'action a été reporté [62] et le développement de nouveaux marqueurs permet d'améliorer ces performances [63] ce qui ouvre la voie vers d'autres possibles améliorations. Un dernier inconvénient de l'imagerie calcique réside dans le mécanisme même des sondes calciques qui induit la mort des cellules en 5 à 6 heures, ne permettant aucun suivi des cultures à long-terme.

C. Les réseaux de microélectrodes (MEA)

Les réseaux de microélectrodes, ou MEA pour « *MicroElectroArray* » sont de loin les plus utilisés en recherche clinique et fondamentale pour détecter l'activité neuronale. Depuis leur première utilisation [63], de nombreux travaux ont été conduits dans le but d'améliorer leurs performances. Aujourd'hui après 40 ans de développement ils sont disponibles commercialement sous différentes géométries et avec différents matériaux, et les distributeurs sont nombreux. Les MEA sont constitués d'une multitude de microélectrodes conductrices adressées en réseaux. Le diamètre des électrodes est typiquement compris entre 10 et 50 μm, et les réseaux présentent pour les plus communément utilisés 60 électrodes. Des réseaux plus denses ont été ponctuellement rapportés [64], de 519 [65], 4096 [66] et 11011 électrodes [67]. Les électrodes sont dans la majorité des cas fabriquées avec des métaux nobles comme l'or ou le platine, ou des alliages de platine/iridium par exemple, déposées sur des matériaux isolants comme le dioxyde de silicium (SiO₂) ou des polymères isolants.

Les MEAS sont très utilisés pour la détection de l'activité neuronale in vitro. Les nombreux exemples d'études utilisant des modèles in vitro cités précédemment en témoignent, puisque la majorité d'entre eux utilisent cette technique pour enregistrer l'activité de leurs cellules. (Voir paragraphe II pour des exemples d'applications). Leur principe de détection est illustré sur la Figure 10 suivante.

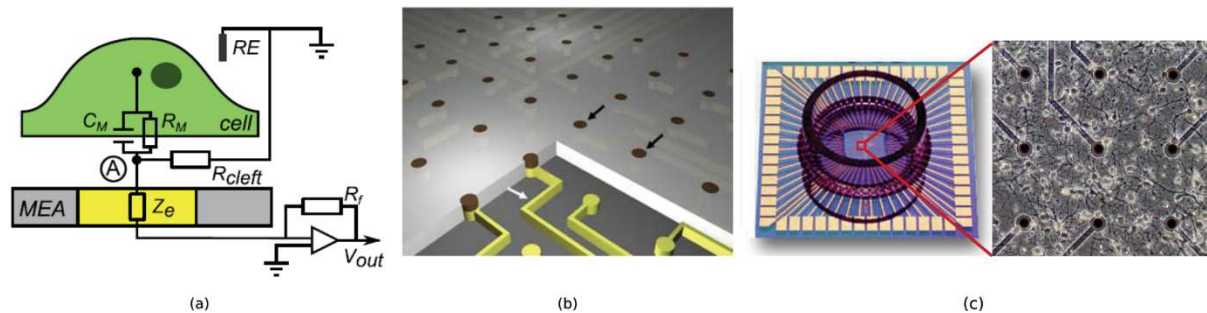


Figure 10 Réseaux de Microélectrodes pour la détection de l'activité électrique neuronale. (a) Principe de la mesure et circuit électrique équivalent simplifié du couplage entre un neurone et une électrode. La membrane de la cellule est décrite par sa capacité C_M , sa résistance R_M et son potentiel membranaire V_M . L'électrode est caractérisée par son impédance Z_e et l'espace formé entre les deux par une résistance R_{cleft} . Le courant mesuré est amplifié en sortie par un amplificateur opérationnel. Adapté de [68]. (b) Schéma illustrant la fabrication des réseaux de microélectrodes planaires. Les électrodes désignées par les flèches noires sont encapsulées dans une matrice isolante, et reliées à la connectique de commande par les lignes conductrices (flèche blanche). (c) Photo d'une culture neuronale contenue dans une chambre fluïdique développée directement sur le MEA, et agrandissement de la zone centrale. Les électrodes sont espacées de 200μm.

Lorsqu'un neurone est actif, les flux d'ions échangés à travers la membrane génèrent un courant extracellulaire I_{extra} . Ce courant circule dans l'espace interstitiel formé naturellement entre la cellule et l'électrode, de résistance R_{cleft} , créant une différence de potentiel V_{extra} par rapport au reste du milieu extracellulaire. Cette différence de potentiel peut être mesurée entre l'électrode en contact avec la cellule et une électrode de référence RE placée dans le milieu extracellulaire. Cette variation de potentiel extracellulaire implique un transfert de charge créant la circulation d'un courant à travers l'électrode. La performance des micro électrodes est alors caractérisée par leur impédance, souvent mesurée à 1KHz correspondant à la fréquence moyenne des potentiels d'actions.

Une des principales limitations des réseaux de microélectrodes réside dans leur forte impédance rendant la détection de faibles signaux extracellulaires difficile. L'impédance de l'électrode est inversement proportionnelle à sa taille. Cependant agrandir la surface de l'électrode pour améliorer le signal détecté ne ferait que diminuer la résolution spatiale, déjà à la limite de la taille d'un neurone unitaire (10μm pour les plus petites). Par conséquent, de nombreuses approches visent à améliorer les performances de mesure en structurant la surface des électrodes, en ajoutant par exemple des nanotubes de carbone [63] ou du noir de platine [69]. Cette structuration a pour objectif principal d'augmenter la résistance R de l'espace séparant la cellule de l'électrode, une résistance plus élevée conduisant à un signal extracellulaire mesuré plus élevé et à un meilleur rapport signal sur bruit. D'autres travaux rassemblés ici [70] rapportent l'utilisation d'électrodes de différentes formes, comme des champignons ou des nanofils verticaux, pour se rapprocher au plus de la mesure du potentiel d'action intracellulaire.

Malgré ces récents développements, la résolution spatiale des microélectrodes reste très mauvaise, puisque la taille de l'électrode reste pour la plupart des systèmes utilisés de l'ordre de la taille d'un neurone, voire supérieure. Il faut de plus immobiliser les neurones individuellement en utilisant les techniques citées en amont pour s'assurer du positionnement adéquat des cellules sur les électrodes. Le dernier inconvénient reste la quantité réduite de cellules détectées simultanément, limitée par le nombre d'électrodes adressables, leur taille et l'électronique liée à l'amplification, l'enregistrement et l'interprétation des signaux.

D. Les réseaux de transistor à effet de champ

Les réseaux utilisant des transistors à effet de champ pour la détection de l'activité neuronale extracellulaire présentent un grand potentiel de miniaturisation contrairement aux MEAs, car leur sensibilité ne décroît pas avec la taille de la zone de détection.

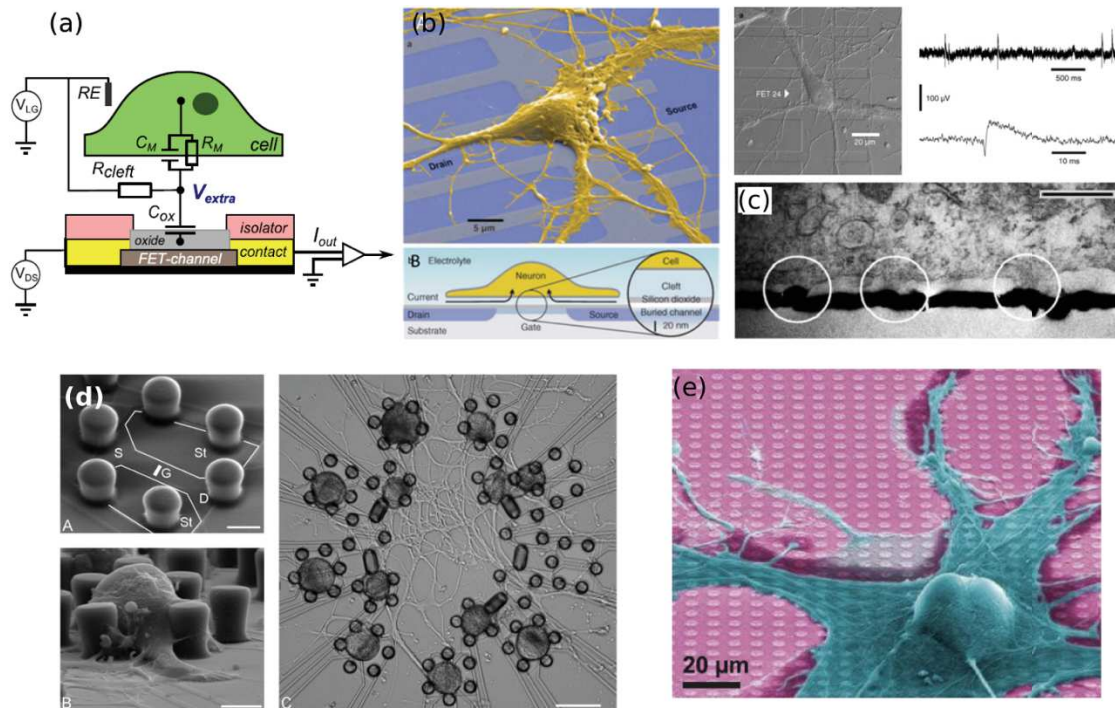


Figure 11 Neurons interfacés à des transistors à effet de champ (FET). (a) Principe de détection des signaux électriques neuronaux par un FET et schéma électrique équivalent simplifié. Adapté de [71]. (b) Image MEB colorée d'un neurone d'hippocampe de rat interfacé à des transistors de type p. L'encart à droite montre l'enregistrement de l'activité électrique spontanée d'un neurone issu de la même culture après DIV 10 (10 jours in vitro). Le schéma du bas montre la vue en coupe d'un neurone interfacé à un transistor, montrant l'espace « cleft » forme entre les deux. Adapté de [72]. (c) Vue en coupe MEB du « cleft » de 100nm d'épaisseur entre une cellule et son substrat [73]. (d) Exemple d'un réseau neuronal simplifié interfacé à un réseau de FET, les corps cellulaires sont piégés sur les transistors par des micro piliers [42]. (e) Neurone interfacé à un réseau MTA (Multi Transistor Array) de 128x128 transistors sur 1mm² [74].

Le principe de l'enregistrement de l'activité électrique à proximité des neurones avec des transistors est illustré Figure 11 (a). On rappelle que pour un transistor MOS classique, le canal semi-conducteur relie la source et le drain, et la grille module la conductivité du canal selon le potentiel qui lui est appliqué. Dans le cas de transistor pour neurone, c'est la partie du neurone à mesurer (axone, dendrite ou soma) située juste au-dessus du transistor qui joue le rôle de grille. Les variations locales de potentiel membranaire modulent la conductivité du canal en changeant la concentration des porteurs de charges. Cette variation de conductivité est détectée en mesurant le courant total circulant dans le canal entre la source et le drain.

L'équipe de Peter Fromherz a été l'une des pionnières en matière d'interface neuronale sur puce. En effet, ils sont les premiers à avoir eu l'idée de fusionner des cellules nerveuses avec des transistors [75]. D'autres travaux ont ensuite suivis utilisant des neurones de mammifères [72],[71] (Figure 11 (b)). Le couplage entre le neurone et le transistor a été caractérisé en profondeur que ce soit d'un point de vue physique ou électrique. Des techniques d'interférométrie [76] ou de microscopie électronique en transmission [73] ont été utilisées pour sonder l'espace interstitiel formé naturellement entre le neurone et le substrat, appelé communément « cleft ». (Figure 11 (b) et (c)).

Ces travaux ont révélé un espace d'une épaisseur typiquement comprise entre 50 et 100nm. Des études ont rapporté le suivi de la propagation d'un signal neuronal sur l'ensemble d'un réseau simplifié [42] [77] (Figure 11 (d)).

Les développements qui ont suivis ont visé à améliorer la résolution spatiale en augmentant le nombre de transistor en contact avec la cellule mesurée, ces progrès ayant été permis par les technologies d'intégration CMOS. La densité de ces réseaux, appelés aussi MTA pour Multi transistor array (Figure 11 (e)) peut atteindre 128x128 transistors concentré sur 1mm² [74][78]. La résolution spatiale de ces capteurs dépend de la taille du transistor. Celle-ci varie pour les exemples cités de 22x24μm² à 2x8μm² permettant la détection de l'activité neuronale à la résolution de la cellule unitaire. La quantité de neurones sondés reste en revanche limitée à quelques cellules tout au plus, et les efforts développés pour accroître la densité de transistor servent souvent à améliorer la résolution spatiale et non la quantité de neurones sondés. D'ailleurs, comme nous l'avons mentionné précédemment, la miniaturisation des transistors n'affecte pas leur sensibilité, et de nombreux travaux se sont engouffrés dans cette course à la miniaturisation pour atteindre des résolutions spatiales subcellulaires en utilisant des transistors à effet de champ à base de nanofil de silicium (*Si nanowire FET*) dont la sensibilité est déjà accrue grâce à leur important rapport surface sur volume par rapport à un transistor classique.

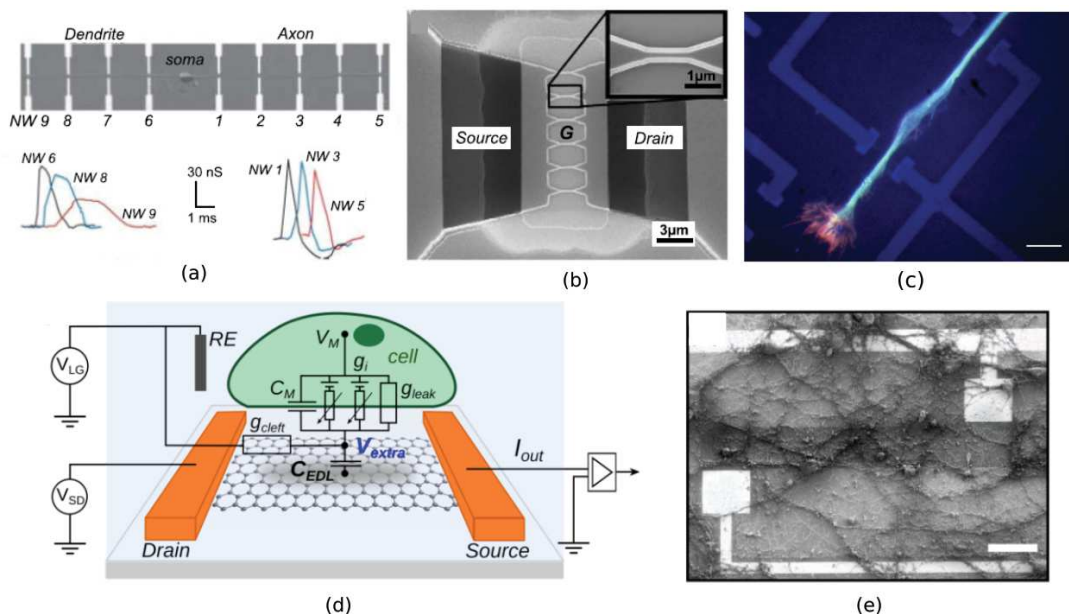


Figure 12 Neurons interfacés à des transistors à effet de champ à base de nanofil (NW-FET) et de graphène (G-FET). (a) Propagation d'un signal neuronal de part et d'autre d'un corps cellulaire enregistrés par plusieurs FET à nanofils à la suite [79]. (b) Transistor à effet de champ à base de nanofil de silicium (SiNW-FET) fabriqué par l'approche descendante (*top down*) [80]. (c) Placement d'un neurone sur des transistors à base de nanofil de silicium contrôlé et guidé par fonctionnalisation chimique [40].

Les premiers travaux rapportant l'utilisation de transistor à effet de champ à base de nanofil de silicium sont attribués à l'équipe de C. Lieber [79]. Ils reportent la mesure et l'enregistrement de signaux provenant d'axones de neurones d'hippocampe de rat à l'aide de transistors à effet de champ à base de nanofils en silicium (SiNW-FET) obtenus par croissance (approche bottom-up), dont les diamètres sont inférieurs à 100nm et l'espacement entre chaque transistor est de 50μm. Bien que les nanofils fabriqués selon cette approche bottom up possèdent des caractéristiques de détection suffisante pour l'enregistrement des signaux neuronaux, leur intégration est compliquée par le positionnement des nanofils fabriqués par croissance sur la zone requise du substrat. L'approche top down en revanche, permet la fabrication de nanofils présentant des caractéristiques électrique similaires [80][81], et offre

par ailleurs des possibilités avantageuses d'intégration à grande échelle tout en permettant le contrôle précis du dimensionnement et du placement des nanofils. Ces nanofils combinés à des techniques de positionnement neuronal passées en revue dans la partie précédente, comme la fonctionnalisation chimique ouvrent la voie à des études *in vitro* sur des réseaux de neurones structurés [40].

Aujourd'hui l'amélioration des performances de résolution spatiale et de détection passe aussi par l'utilisation de nanomatériaux comme le graphène, dont les propriétés électriques remarquables en font un matériau de choix pour remplacer les nanofils comme canal du transistor à effet de champ. Les premiers travaux à avoir montré la capacité des transistors à effet de champ à base de graphène (G-FET) pour la détection de l'activité cellulaire ont été menés par l'équipe de C. Lieber en 2010 [81] suivis puis par celle de J. Garrido en 2011 [82]. Ces travaux relataient l'utilisation de cellules de cardiomyocytes de lignées. Des travaux reportant l'enregistrement de l'activité de neurones primaires d'hippocampe de souris en utilisant des G-FET ont récemment été menés [55].

Bien que l'ensemble de ces développements récents visent à améliorer les performances de détection et rapportent des réseaux d'électrodes ou de transistors toujours plus denses, ces perfectionnements servent surtout à améliorer la résolution spatiale et la qualité des signaux détectés et non la quantité de neurones sondés. Celle-ci reste limitée à quelques cellules au maximum.

Conclusion de la partie III

Ces différentes techniques permettent l'enregistrement des différentes signatures d'un signal neuronal *in vitro*. Leurs caractéristiques de détection sont résumées et comparées dans le tableau récapitulatif suivant.

Tableau 1 Caractéristiques des principales techniques de détection de l'activité neuronale *in vitro*.

	Signal détecté	Résolution spatiale	Nombre de neurones détectés simultanément	Autre
Patch-clamp	Conductance des canaux ioniques (configuration <i>cell-attached</i>)	Subcellulaire $< \mu\text{m}^2$	1 partie de neurone	
	V_{INTRA} (configuration <i>whole-cell</i>)	Cellulaire $1 \mu\text{m}^2$	1 neurone	Invasif
Imagerie calcique	Variation d'intensité de fluorescence	Subcellulaire $< \mu\text{m}^2$ avec objectif x100 (Cellulaire ou plus) $1-100 \mu\text{m}^2$ avec autres objectifs	1 neurone Jusqu'à ~100 neurones	Invasif : mort des cellules en 5 à 6h due au marquage
MEA	V_{EXTRA} ou LFP (ou V_{INTRA} pour certaines électrodes 3D de type champignon ou nanofil pénétrant la cellule)	$100-2000 \mu\text{m}^2$ (Diamètre électrode = $10-50 \mu\text{m}$)	Densité d'électrodes : ~50 électrodes/ mm^2 (\Rightarrow 10 à 50 neurones/ mm^2) Max : 500 électrodes/ mm^2 (Potentiellement 500 neurones)	
FET	V_{EXTRA}	Cellulaire	Taille capteur $\sim 1 \text{mm}^2$	

		10-600 μm^2 (taille électrode de 22x24 μm^2 à 2x8 μm^2)	(\Rightarrow ~500 neurones/ mm^2 selon la densité de neurones)	
NW-FET et G-FET	V_{EXTRA}	Subcellulaire <1 μm^2 (Diamètre des nanofils <100nm)	Idem mais avec beaucoup plus de transistors à contrôler	

IV. Approche et objectifs

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre d'un projet global, dont le but ultime est de recréer des plateformes *in vitro* grâce à des outils microfluidiques pour reproduire des circuits fonctionnels chargés, à terme, de modéliser les maladies neurodégénératives. Ce projet, appelé CONNEXIO, a été lauréat d'une ERC Grant obtenue en 2016 par T. Honegger, alors chargé de recherche CNRS au LTM et co-encadrant de cette thèse jusqu'en avril 2017.

Le projet dans son ensemble s'inspire de la connectomique, discipline visant à étudier l'ensemble des connexions neuronales du cerveau [83]. Cette discipline émergente consiste à associer le cerveau à des schémas topologiques complexes, reproduisant l'ensemble des connexions et assurant les fonctions liées à leur structure [25]. L'approche à l'échelle d'un système entier impliquant des réseaux complexes composés de populations entières de cellules est privilégiée par rapport à des approches cellulaires, ce qui permet, par exemple, de reproduire des boucles cérébrales complexes au cœur des affection neurodégénératives (comme la boucle cortico-basal-ganglia-thalamo-corticale (CBGTC), impliquée dans la maladie d'Huntington ou d'Alzheimer [84]).

La première partie du projet visait à recréer les structures *in vitro* de ces réseaux denses de neurones (plusieurs milliers de cellules), une population donnée de neurones représentant un nœud du réseau et étant reliée à d'autres nœuds. Une fois la structure de ces réseaux complexes reproduite dans des puces microfluidiques, le deuxième défi consiste à accéder à l'activité neuronale unitaire, sur l'ensemble de ce réseau, afin d'en évaluer la fonction. Cependant comme nous venons de le voir dans la partie précédente passant en revue les techniques d'enregistrement de l'activité neuronale *in vitro*, aucun des outils actuellement disponibles ne permet de disposer à la fois de la résolution spatiale cellulaire, et d'un champ d'observation suffisamment grand pour accéder simultanément à tous les neurones du réseau.

C'est dans ce contexte scientifique que s'inscrivent ces travaux de thèse, dont l'objectif est de lever cette contrainte en développant une nouvelle technique d'enregistrement de l'activité neuronale *in vitro*. L'approche proposée consiste à interfacer les neurones en culture *in vitro* à un transducteur électro-optique novateur à base de cristaux liquides, capable de convertir les signaux électriques issus de l'activité neuronale en variation d'intensité optique. Couplé à un capteur imageur adapté (sans lentille de type CMOS, d'une surface de quelques cm^2 contenant plusieurs Mpx, avec une résolution subcellulaire de l'ordre du μm^2), ce dispositif devrait permettre l'enregistrement de l'activité neuronale d'un réseau complexe (plusieurs millions de neurones) de manière non invasive (aucun marquage n'est requis), et à la résolution du neurone unique.

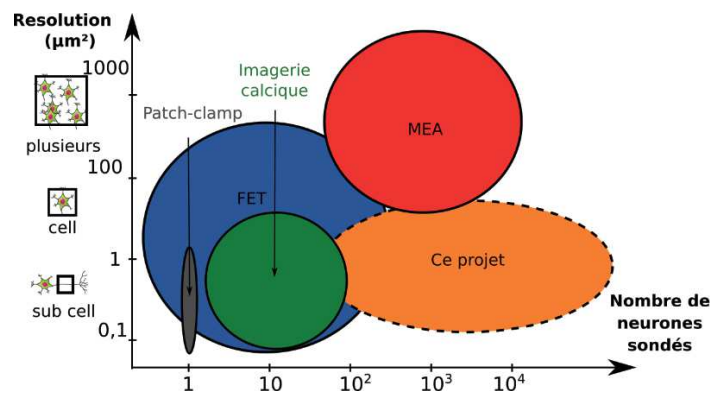


Figure 13 Positionnement du projet par rapport à l'état de l'art. Résolution et quantité de neurones détectables simultanément pour les techniques connues d'enregistrement de l'activité neuronale in vitro.

Le dispositif imaginé pour répondre à ces spécifications sera alors constitué des éléments suivants :

- Un module d'éclairage
- Une partie fluide pour contenir les neurones, à terme structurés en réseaux fonctionnels
- Un transducteur électro optique constitué d'une part des cristaux liquides, et d'autre part d'une interface séparant la partie active de la partie fluide contenant les neurones en culture. Cette interface est chargée de transmettre les signaux neuronaux à la partie active du transducteur (les cristaux liquides).
- Un capteur optique sans lentille, de type CMOS.

Le **chapitre 2** de ce manuscrit sera consacré à la partie active de la transduction : les cristaux liquides. Le **chapitre 3** traitera de la conception et de la réalisation de l'interface neurones/ CL alors que le **chapitre 4** sera dédié à l'assemblage du dispositif complet et à ses caractéristiques de détection.

Chapitre 2

La transduction électro-optique des cristaux liquides.

Les cristaux liquides, comme leur nom le suggère, sont des matériaux présentant des propriétés physiques intermédiaires entre les phases solides et liquides. Ils ont été découverts pour la première fois en 1888 par F. Reinitzer et doivent leur nom à O. Lehmann depuis 1904 [85]. Ils ont par la suite fait l'objet de nombreuses études, de leur comportement fondamental à leurs applications diverses. Bien que l'effet d'interrupteur optique électriquement contrôlé utilisé par tous les afficheurs à cristaux liquides aujourd'hui ait été découvert en 1927 par V. Fréedericksz (et nommé d'après lui transition de Fréedericksz), les premiers afficheurs à cristaux liquides ne sont apparus que dans les années 1960 [86]. Les techniques d'affichage basées sur les propriétés des cristaux liquides n'ont depuis cessé d'évoluer, et les dispositifs à cristaux liquides ou LCD (*liquid crystal displays*) sont omniprésents dans notre quotidien puisqu'on les retrouve dans tous nos écrans, ordinateurs, téléphones portables, montres, calculatrices, etc.

Nous allons voir dans la première partie de ce chapitre quelques généralités et formalismes des cristaux liquides ainsi que leurs propriétés physiques singulières, et comment celles-ci sont exploitées dans les applications électro-optiques les plus courantes. Puis nous verrons en quoi ces caractéristiques propres aux cristaux liquides sont en théorie adaptées à la détection de l'activité neuronale et comment nous comptons à notre tour les utiliser pour transcrire les signaux électriques des neurones en variation d'intensité optique. Enfin dans une dernière partie nous décrirons les étapes technologiques et les matériaux choisis pour la fabrication de notre dispositif à cristaux liquides.

I. Généralités sur les cristaux liquides et leurs applications à la visualisation

L'état cristal liquide est une mésophase, c'est-à-dire un état intermédiaire de la matière condensée présentant des caractéristiques communes à l'état cristallin (ordre de position des molécules entraînant une anisotropie spatiale et par conséquent une anisotropie des propriétés physiques) et à l'état liquide (écoulement). Les substances pouvant présenter cet état intermédiaire de la matière appelées couramment cristaux liquides, sont également connues sous l'appellation de mésomorphes, ou mésogènes. La transition vers cette phase intermédiaire peut s'opérer selon deux procédés qui correspondent aux deux familles de cristaux liquides : soit par dissolution dans des solvants, les cristaux liquides appartiennent alors à la famille des lyotropes, soit par variation de la gamme de température, ce sont alors des cristaux liquides thermotropes [87]. Pour ces derniers, la phase cristal liquide est observée dans un domaine limité de température. Nous évoquerons par la suite uniquement les cristaux liquides de types thermotropes, les plus fréquemment utilisés en optoélectronique.

Les cristaux liquides thermotropes peuvent voir leur phase cristal liquide subdivisée en plusieurs phases selon le degré d'ordre qui règne dans l'organisation moléculaire [88]. Certains présentent

plusieurs de ces phases, d'autres n'en présentent qu'une. L'agitation thermique ayant tendance à favoriser le désordre moléculaire, les phases les plus ordonnées présentant les plus hauts degrés de symétries sont toujours situées vers des domaines des plus basses températures, et les états moins ordonnés situés vers la plage des hautes températures. Ainsi, on distingue deux phases cristal liquides principales : la phase nématique, pour laquelle les molécules s'orientent parallèlement les unes aux autres, tout en restant distribuées aléatoirement dans le volume, et la phase smectique pour laquelle les molécules présentent en plus d'un alignement parallèle global un arrangement en couches qui leur confère un ordre positionnel supplémentaire, cf. Figure 14. Nous nous focaliserons par la suite uniquement sur l'ordre nématique qui est le plus utilisé dans les applications électro-optiques.

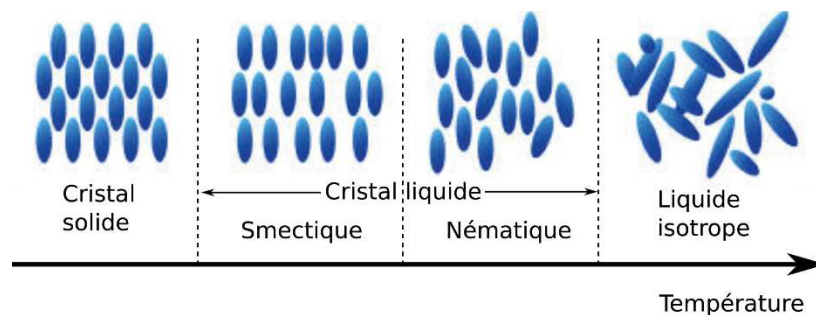


Figure 14 Succession des phases d'un cristal liquide thermotrope. Adapté de [89].

Les cristaux liquides sont des composés organiques qui présentent une forte anisotropie de forme géométrique. Bien que les molécules de cristaux liquides puissent prendre des formes distinctes comme par exemple celle d'un disque (les discotiques) ou encore d'un bâtonnet courbé comme une banane (cristaux liquides plastiques), la majorité des cristaux liquides utilisés dans les applications liées à l'affichage sont des cristaux liquides calamitiques présentant une forme allongée et droite de bâtonnet, comme schématisés sur la Figure 14. Ces cristaux liquides calamitiques sont des molécules mesurant typiquement 2 à 5 nm de long pour un diamètre de 0,5 à 1 nm et ont une structure chimique qui consiste généralement en un groupe central formé de plusieurs cycles et de groupes terminaux. La structure chimique des cristaux liquides influence bien évidemment leurs propriétés, et notamment la plage de température dans laquelle ils ont leur phase nématique. Ainsi par exemple, plus une molécule est longue et plus l'énergie thermique nécessaire pour changer l'ordre de la phase cristal liquide doit être grande. Par conséquent, la température de transition entre la phase nématique et la phase liquide isotrope augmente avec la longueur des molécules [88]. Le premier cristal liquide présentant une phase nématique à température ambiante est le MBBA (n-4'-MethoxyBenzylidene-n-ButylAniline), synthétisé pour la première fois en 1969 [90]. Aujourd'hui la plupart des cristaux liquides utilisés sont des mélanges, synthétisés dans le but de répondre aux nécessités des applications visées.

Un exemple de la structure moléculaire du cristal liquide simple PCH-5, et d'un cristal liquide composé E7 (de chez Merck) qui seront utilisés dans ces travaux de thèse est donné Figure 15. Des cristaux liquides composés peuvent en effet présenter leur phase nématique sur des plages de température bien plus grande que des cristaux liquides simples, une meilleure stabilité ou encore des propriétés électro-optiques les rendant plus performants dans les applications liées à l'affichage [91], nous allons voir lesquelles par la suite.

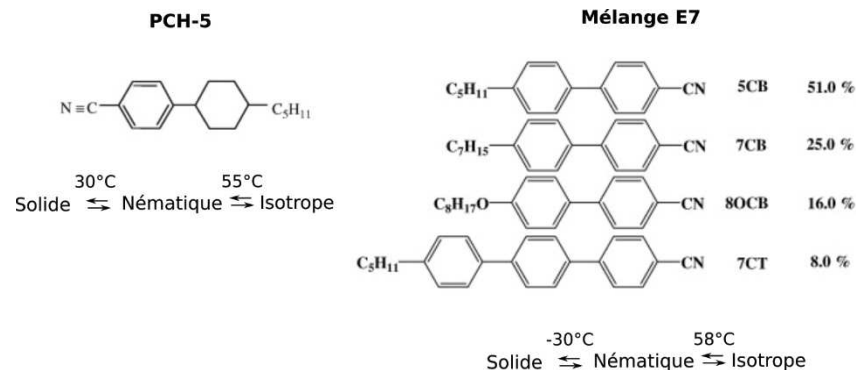


Figure 15 Structure moléculaire et température de transition de phase du cristal liquide simple PCH-5 à gauche et du cristal liquide composé E7 (Merck) à droite. Pour le mélange E7, la structure moléculaire, le nom et la proportion de chacun des constituants sont rappelés. Données issues de [92].

Nous avons vu que les cristaux liquides nématiques présentaient un certain ordre à l'échelle moléculaire. Dans le cas de la phase nématique, le mécanisme d'orientation repose sur des interactions moléculaires à très longue portée, l'orientation du cristal liquide en un point se propageant sur des dizaines de microns, une distance considérable par rapport à la dimension des molécules. Les interactions à longue distance confèrent aux molécules de cristal liquide un comportement collectif. Le fort facteur de forme causé par la géométrie allongée des molécules entraîne une orientation individuelle des molécules de façon parallèle selon leur axe le plus long. Bien que l'agitation thermique empêche les molécules d'être alignées parfaitement, à l'échelle macroscopique on peut définir en chaque point une direction moléculaire moyenne décrite par un vecteur unité \vec{n} appelé directeur local, qui décrit ce qui est communément appelé la texture du cristal liquide.

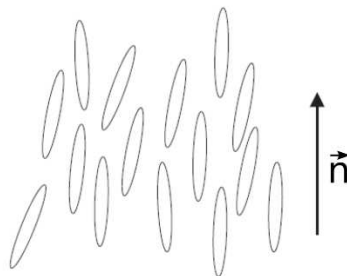


Figure 16 Arrangement moléculaire et direction moyenne des molécules décrite par le directeur local \vec{n} dans une phase nématique.

Cette texture peut être modifiée par des interactions extérieures comme un champ électrique typiquement, la réorientation des molécules étant permise par le caractère fluide des cristaux liquides. C'est cette caractéristique, combinée à l'anisotropie des propriétés physiques induite par la forte anisotropie de forme des molécules qui sont utilisées dans les applications électro optiques pour l'affichage.

A. Propriétés physiques

Nous allons maintenant passer en revue ces propriétés physiques particulières des cristaux liquides exploitées dans les applications électro-optiques. Les éléments présentés dans la partie suivante sont extraits de plusieurs ouvrages : [93][94][95].

- Anisotropie optique (biréfringence)

Comme décrit précédemment, les cristaux liquides ont une orientation moléculaire globale préférentielle décrite par un vecteur \vec{n} leur conférant un axe de symétrie. Ce haut degré de symétrie implique un comportement optique uniaxe. La lumière qui traverse le milieu peut se propager avec deux indices de réfraction différents, selon sa direction de polarisation. L'indice de réfraction extraordinaire noté n_e correspond à une polarisation de la lumière parallèle au directeur local n . L'indice de réfraction ordinaire, noté n_o correspond à une polarisation perpendiculaire.

L'anisotropie optique du cristal liquide est alors donnée par la différence de ces deux indices :

$$\Delta n = n_e - n_o \quad (1)$$

Généralement les cristaux liquides utilisés pour l'affichage possèdent une anisotropie optique positive.

➤ Anisotropie diélectrique

Dans la plupart des dispositifs d'affichage à cristaux liquide, c'est un champ électrique extérieur qui est utilisé pour modifier l'orientation du cristal liquide. L'interaction entre le champ électrique et le cristal liquide dépend de la permittivité électrique ϵ qui relie l'intensité du champ électrique E et l'induction électrique D , selon l'équation de Maxwell : $\vec{D} = \epsilon \vec{E}$. Pour des milieux anisotropes comme les cristaux liquides, la permittivité a la forme d'un tenseur et ses valeurs mesurées dépendent de la direction du champ électrique par rapport à l'orientation du cristal liquide. Pour la structure nématique, qui présente un axe de symétrie, ϵ a deux composantes : la première correspond à une direction du champ parallèle au vecteur local, appelée permittivité diélectrique parallèle et notée $\epsilon_{//}$ et la deuxième correspond à une direction perpendiculaire au vecteur local, notée ϵ_{\perp} . L'anisotropie diélectrique est alors la différence entre ses deux composantes, donnée par :

$$\Delta \epsilon = \epsilon_{//} - \epsilon_{\perp} \quad (2)$$

L'anisotropie diélectrique définit la force de couplage entre le champ électrique et la réorientation du cristal liquide. Les cristaux liquides qui présentent une anisotropie diélectrique positive s'orienteront parallèlement au champ, à l'inverse ceux qui présentent une anisotropie diélectrique négative s'orienteront perpendiculairement au champ électrique.

L'anisotropie diélectrique varie avec la fréquence, un exemple est donné pour le cristal liquide PCH5 Figure 17 ce qui limite le choix du signal électrique appliqué dans la plage de fréquence correspondant à des valeurs constantes de l'anisotropie diélectrique. Souvent la fréquence choisie est centrée dans cette fenêtre, autour de 1kHz.

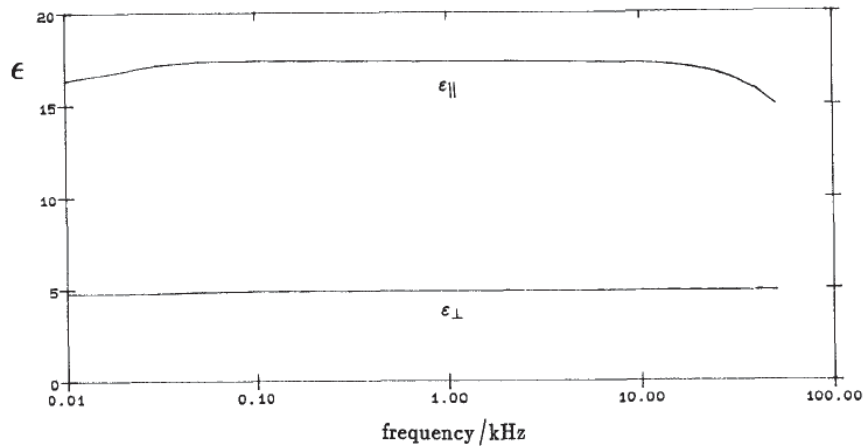


Figure 17 Evolution de $\epsilon_{||}$ et ϵ_{\perp} pour le cristal liquide PCH5 pour des fréquences comprises entre 10Hz et 100KHz. Issu de [96]

Ces deux propriétés sont essentielles dans l'application des cristaux liquides à des dispositifs électro-optiques. Leurs propriétés mécaniques jouent également un rôle dans les caractéristiques de ces dispositifs, et notamment sur la dynamique de réponse des cristaux liquides.

➤ Viscosité

Les cristaux liquides sont caractérisés par des coefficients de viscosité dynamique qui définissent l'écoulement de la substance dans le volume qui lui est attribué. Ces valeurs dépendant de la température sont surtout utilisées pour renseigner sur la vitesse de remplissage des écrans à cristaux liquides, qui peut avoir un impact pour leur fabrication à l'échelle industrielle. Un autre paramètre important qui caractérise un cristal liquide nématique est sa viscosité rotationnelle, notée γ_1 qui renseigne sur la vitesse de réorientation locale des molécules de cristal liquide, et qui par conséquent est liée aux temps de réponse des dispositifs à cristaux liquides. Les temps de réponses seront discutés plus en détail plus loin dans ce chapitre.

➤ Constante élastique

Le comportement élastique d'un cristal liquide soumis à une déformation extérieure est défini par trois constantes notées k_{11} , k_{22} et k_{33} , qui correspondent à des déformations de la texture du cristal liquide. Elles correspondent respectivement à des déformations en éventail, de torsion et de flexion de la structure nématique, comme illustré Figure 18. Ces constantes sont des paramètres qui décrivent la force de rappel avec laquelle les molécules de cristaux liquides retournent à leur texture initiale, après avoir été déformé par une force extérieure, typiquement un champ électrique. Elles prennent des valeurs de l'ordre du pico newton.

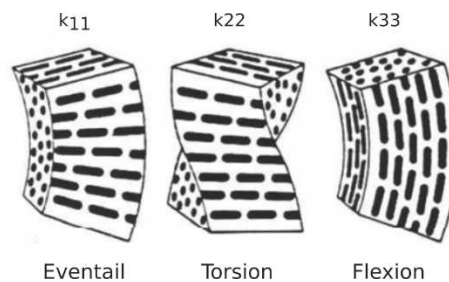


Figure 18 Déformations élémentaires d'un cristal liquide et constantes élastiques associées. Adapté de [97].

Nous allons maintenant aborder l'application de ces propriétés physiques propres aux cristaux liquides aux dispositifs d'affichage et voir comment elles influencent leurs performances.

En résumé et pour donner un ordre d'idée des valeurs de chacune de ces caractéristiques, le Tableau 2 ci-dessous regroupe les principales propriétés physiques des cristaux liquides utilisés dans cette thèse. Les raisons de leur choix seront discutées plus loin dans ce chapitre.

Tableau 2 Propriétés physiques des cristaux liquides nématiques PCH-5 et E7. Les valeurs sont données à 38,5°C pour PCH-5 et à 20°C pour E7. Données issues de [98],[99],[100],[101],[102].

	PCH-5	E7
Anisotropie optique (à 589nm)		
n_e	1,5956	1,7464
n_o	1,4863	1,5211
Δn	0,1093	0,2253
Anisotropie diélectrique (à 1KHz)		
$\epsilon_{//}$	14,4	19,0
ϵ_{\perp}	5,2	5,2
$\Delta\epsilon$	9,2	13,8
Viscosité rotationnelle γ_1 [mPa.s]	53,2	166
Constantes élastiques [$\times 10^{-12}$ N]		
K_{11}	7,3	11,1
K_{22}	4,5	10,32
K_{33}	13,2	17,1

B. Techniques d'affichage exploitant les propriétés des cristaux liquides

Nous l'avons cité en introduction, les premiers dispositifs exploitant les propriétés d'anisotropie optique des cristaux liquides, ainsi que leur interaction avec un champ électrique extérieur sont apparus dans les années 60. Un dispositif (ou une cellule) à cristaux liquides nématiques est en réalité l'équivalent d'un condensateur plan, le cristal liquide jouant le rôle du diélectrique, à la différence près que les cristaux liquides comme on vient de le voir présentent deux constantes diélectriques. Les électrodes de ce condensateur sont traitées (nous verrons après de quelle manière) de façon à imposer à la couche de cristaux liquide une texture particulière qui incarne alors son point d'équilibre. Le cas d'un afficheur orientant les molécules de façon parallèles aux électrodes sur l'ensemble du condensateur est montré Figure 19. Ce sont les forces élastiques exercées par les surfaces sur les cristaux liquides, ainsi que les interactions moléculaires à longue distance qui leur imposent cette position d'équilibre.

L'application d'un champ électrique à travers la couche de cristal liquide, perpendiculaire à l'orientation des molécules (perpendiculaire au vecteur directeur \vec{n}) cause une déformation dans la structure de la couche de cristal liquide, éloignant les molécules de leur position d'équilibre. Si le cristal liquide a une anisotropie positive, les molécules s'orientent alors parallèlement au champ électrique. Cette réorientation, appelée transition de Fréedericksz débute dès que la tension appliquée entre les deux plaques dépasse une valeur seuil.

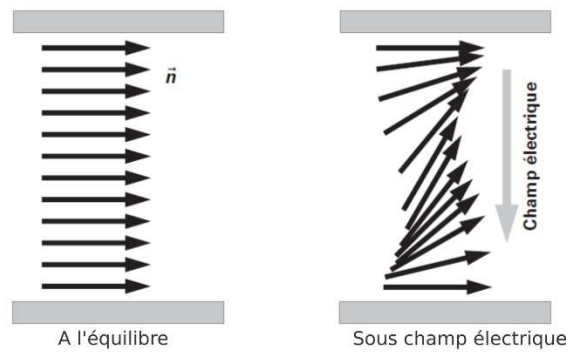


Figure 19 Transition de Fréedericksz pour un cristal liquide nématique à anisotropie diélectrique positive, contraint par un alignement planaire. Adapté de [91].

Lorsque le champ est retiré, les forces élastiques de rappel les contraignent à reprendre leur position d'équilibre. L'intensité de la lumière que l'on transmettrait à travers un tel condensateur à capacité électriquement contrôlée peut ainsi être modulée grâce aux propriétés uniques d'anisotropie diélectrique, de biréfringence ainsi qu'aux constantes élastiques de cristaux liquides.

Il existe aujourd'hui plusieurs configurations différentes tirant profit de ces propriétés pour convertir un champ électrique extérieur en variation d'intensité optique, mais une des premières techniques à être apparue, qui reste la plus utilisée aujourd'hui et sur laquelle nous nous focaliserons est le mode nématique torsadé, plus connu sous son nom anglophone « *twisted nematic* », abrégé TN et inventée au début des années 1970 [103].

La configuration nématique torsadée

Un dispositif à cristaux liquides en configuration nématique torsadée est composé d'une couche mince de cristaux liquide confinée entre deux substrats plans de verre, séparés par des espaceurs maintenant une épaisseur uniforme de la couche de cristaux liquides. Les faces internes des substrats de verre sont recouvertes d'un matériau conducteur transparent, souvent de l'ITO (*Indium Tin Oxide*). Une des faces conductrices peut être structurée avec la forme des pixels à afficher, la deuxième face, uniforme, joue alors le rôle de la contre-électrode. Les faces internes de ces électrodes sont également traitées de manière à assurer l'alignement des molécules de cristaux liquides parallèlement à la surface. Traditionnellement, ce traitement est une couche de polymère brossée mécaniquement avec un linge dans une direction unique, ce qui aurait pour effet d'orienter les chaînes de polymères dans la même direction et d'aligner les molécules sous-jacentes [104]. Ce mécanisme d'alignement reste en réalité mal compris et très discuté dans la communauté scientifique [105], certains proposant comme explication un alignement mécanique des cristaux liquides par les micro canaux creusés par le frottement du polymère [106]. Même si cette méthode est toujours employée, de nouvelles techniques d'alignement ont aujourd'hui émergé, nous discuterons des diverses technologies et matériaux de fabrication utilisés dans l'industrie des dispositifs à cristaux liquides dans le paragraphe I.C de ce chapitre.

Les deux substrats ainsi fonctionnalisés sont placés dans le cas d'une cellule nématique torsadée de manière à ce que leurs directions d'alignement soient perpendiculaires. Ceci a pour effet d'imposer aux cristaux liquides une texture torsadée à 90° dans leur état d'équilibre, comme illustré sur la Figure 20 (gauche).

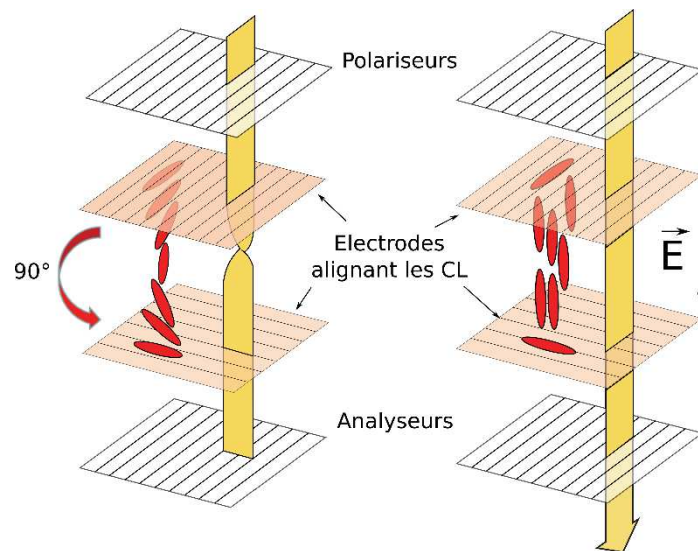


Figure 20 Principe de fonctionnement d'une cellule à cristal liquide en configuration nématique torsadée, en mode "normally black" (i.e. la cellule dans son état d'équilibre (sans champ électrique) ne transmet pas la lumière).

Deux polariseurs linéaires sont rajoutés de part et d'autre de la cellule décrite, leur direction de polarisation parallèle à l'alignement des électrodes, et par conséquent parallèle au directeur local de la texture nématique. Lorsque la lumière incidente, polarisée rectilignement après avoir traversé le premier polariseur pénètre la cellule, l'action de guide d'onde de la structure torsadée opère et tourne la polarisation de la lumière de 90° .

Cet effet, discuté plus loin, est possible lorsque la longueur d'onde de la lumière incidente (typiquement 550 nm, au centre de la plage du spectre visible) est petite devant l'épaisseur de la cellule.

La lumière présente alors une direction de polarisation normale à celle de l'analyseur en sortie, elle est alors absorbée par ce dernier. Cette configuration, illustrée sur la Figure 20 (gauche) représente le « *dark off state* » : aucune lumière ne passe à la position d'équilibre.

Lorsqu'une différence de potentiel dépassant un certain seuil est appliquée à travers la cellule, les molécules au centre, et donc le directeur local \vec{n} , commencent à s'incliner pour s'aligner dans la direction du champ électrique. Cela a pour conséquence de casser la structure en hélice et de diminuer la biréfringence moyenne effective. Les molécules s'alignent progressivement en partant du centre au fur et à mesure que l'intensité du champ électrique augmente, jusqu'à ce que toutes les molécules se retrouvent alignées dans la direction du champ électrique, rompant complètement l'hélice. (Notons cependant que les molécules en contact avec la surface y restent solidement ancrées car les forces d'ancrage y sont plus importantes que les forces coulombiennes du champ extérieur). Cette nouvelle texture globale n'est alors plus optiquement anisotrope, (la biréfringence effective devient nulle) et la polarisation de la lumière ne subit plus de rotation. La lumière polarisée rectilignement par le premier polariseur ressort de la cellule en conservant sa direction de polarisation, elle est alors transmise par l'analyseur en sortie puisque leurs directions de polarisation coïncident.

C'est la configuration illustrée sur la Figure 20 (droite), appelée « *bright on state* » : la lumière est transmise lorsqu'un champ électrique est appliqué. Ce cas de figure où les polariseurs ont leurs directions de polarisation parallèles entre elles est appelé le « *normally black state* », c'est le cas le plus fréquemment utilisé. Un cas de figure alternatif peut également être obtenu en plaçant les polariseurs perpendiculaires entre eux, menant alors à un état lumineux lorsqu'aucun champ

électrique n'est appliqué, appelé « *bright off state* », et un état sombre en présence d'un champ électrique, le « *dark on state* ».

Condition de Gooch-Tarry

Ce comportement de guide d'onde des cristaux liquides exploité dans une cellule nématique torsadée et qui permet à la lumière de voir sa polarisation tournée de 90° en suivant la structure en hélice comme on vient de le décrire n'est possible que si le paramètre de Mauguin, défini par :

$$u = \frac{2\Delta n d}{\lambda} \quad (3)$$

(avec Δn l'anisotropie optique ou biréfringence, d l'épaisseur de la couche de cristaux liquides et λ la longueur d'onde de la lumière incidente), satisfait la condition du même nom, à savoir :

$$u \gg 1 \quad (4)$$

En réalité cette condition est rarement satisfaite, car cela implique des épaisseurs de cellules trop grandes qui conduisent à des temps de réponses trop importants. Dans le cas où cette condition n'est pas satisfaite, la lumière polarisée rectilignement qui pénètre la cellule ressort polarisée circulairement, l'effet de guide d'onde désiré n'est alors pas observé. Les travaux de Gooch et Tarry en 1975 [107] ont cependant montré qu'il était possible d'obtenir cet effet recherché de guide d'onde dans des cellules même très minces (<10µm) à condition que l'épaisseur de cellule et la biréfringence du cristal liquide respectent certaines valeurs précises. Ils ont en effet montré que la transmission optique à travers une cellule nématique torsadée suivait la relation :

$$T = \frac{1}{2} \frac{\sin\left(\frac{\pi}{2} \sqrt{1+u^2}\right)}{1+u^2} \quad (5)$$

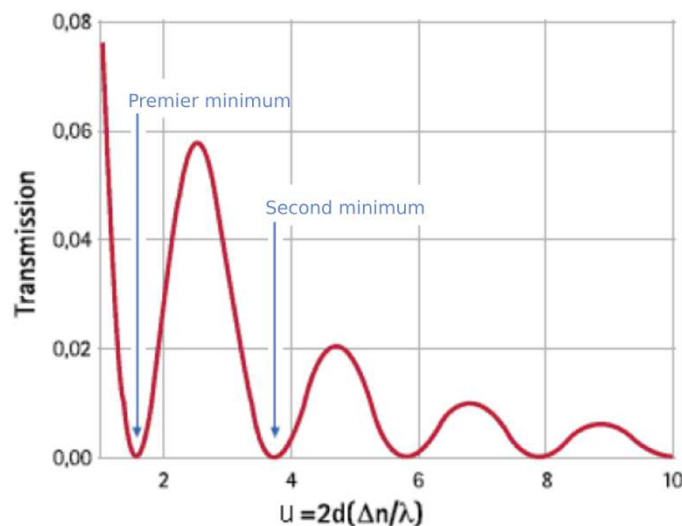


Figure 21 Courbe de Gooch-Tarry : transmission optique à travers une cellule nématique torsadée en fonction du paramètre de Mauguin $u = \frac{2d\Delta n}{\lambda}$. Adapté de [108].

Ainsi pour une cellule en *normally black mode*, (aucune lumière n'est transmise lorsqu'aucun champ électrique n'est appliqué) la transmission est nulle ($T=0$) pour une série de valeurs particulières du coefficient u . En effet :

$$T = 0 \Leftrightarrow \frac{\pi}{2} \sqrt{1 + u^2} = k\pi \quad k \in \mathbb{Z}^*$$

$$\Leftrightarrow u = \sqrt{(2k)^2 - 1} \quad k \in \mathbb{Z}^*$$
(6)

u peut alors prendre les valeurs $\sqrt{3}$, $\sqrt{15}$, $\sqrt{35}$, etc. appelées premier minimum, second minimum, etc. Ces valeurs discrètes de u conditionnent les valeurs de l'épaisseur de la cellule (d) et de la biréfringence des cristaux liquides (Δn) pour lesquelles le comportement de guide d'onde est observé. Plus l'épaisseur de cristal liquide est grande, plus le temps de réponse de la cellule sera grand. Pour cette raison il est plus intéressant de travailler à la condition du premier minimum ($u = \sqrt{3}$) qui donne la plus petite valeur de l'épaisseur pour laquelle l'effet de Mauguin est observé, à savoir :

$$d = \frac{\lambda\sqrt{3}}{2\Delta n}$$
(7)

Les cristaux liquides ayant des valeurs d'anisotropie optique de l'ordre de 0,05 à 0,3 les cellules nématiques torsadées ont une épaisseur pouvant être comprise entre 2 et 10 μm , pour une longueur d'onde de référence de 550nm (valeur centrale de la gamme visible 400nm-700nm à laquelle l'œil est le plus sensible).

Caractéristiques électro-optiques :

La réponse caractéristique d'une cellule nématique torsadée à un champ électrique est donnée Figure 22.

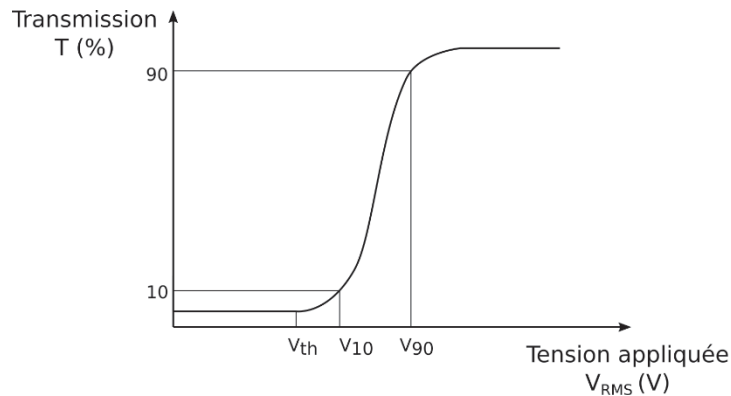


Figure 22 Réponse électro-optique caractéristique d'une cellule nématique torsadée: transmission optique normalisée en fonction de la tension appliquée.

- Seuil de détection

La tension à partir de laquelle les molécules se réorientent, notée V_{th} , pour « *threshold voltage* » en anglais ou tension seuil, est donnée par

$$V_{th} = \pi \sqrt{\frac{K_{11}}{\varepsilon_0 \Delta \varepsilon} \left[1 + \frac{1}{4} \left(\frac{K_{33}}{K_{11}} - 2 \frac{K_{22}}{K_{11}} \right) \right]}$$
(8)

Avec ϵ_0 la permittivité du vide, $\Delta\epsilon$ l'anisotropie diélectrique du cristal liquide et K_{11} , K_{22} , K_{33} ses constantes élastiques.

- Sensibilité (ou raideur électro-optique)

On peut également définir la raideur électro-optique γ (aussi notée a) de la cellule qui correspond à la pente de la partie linéaire de sa courbe électro-optique, soit entre 10 et 90% de la transmission optique. Plus la différence $V_{90} - V_{10}$ sera faible, et plus la pente sera importante, plus la cellule sera sensible à une variation de tension à ses bornes.

$$\gamma = \frac{\Delta T}{\Delta V} = \frac{90\% - 10\%}{V_{90} - V_{10}} \quad (9)$$

- Contraste

Le contraste, noté CR pour *Contrast Ratio* peut être défini par le rapport des valeurs maximale et minimale de luminosité soit :

$$C = \frac{T_{90} - T_{10}}{T_{10}} \quad (10)$$

- Réponse dynamique

La réponse temporelle d'une cellule nématique torsadée à un créneau de tension est donnée Figure 23. Notons qu'il est important d'appliquer un signal électrique alternatif de valeur moyenne nulle à la couche de cristal liquide, la présence d'une composante continue entraînant une électrolyse du cristal liquide.

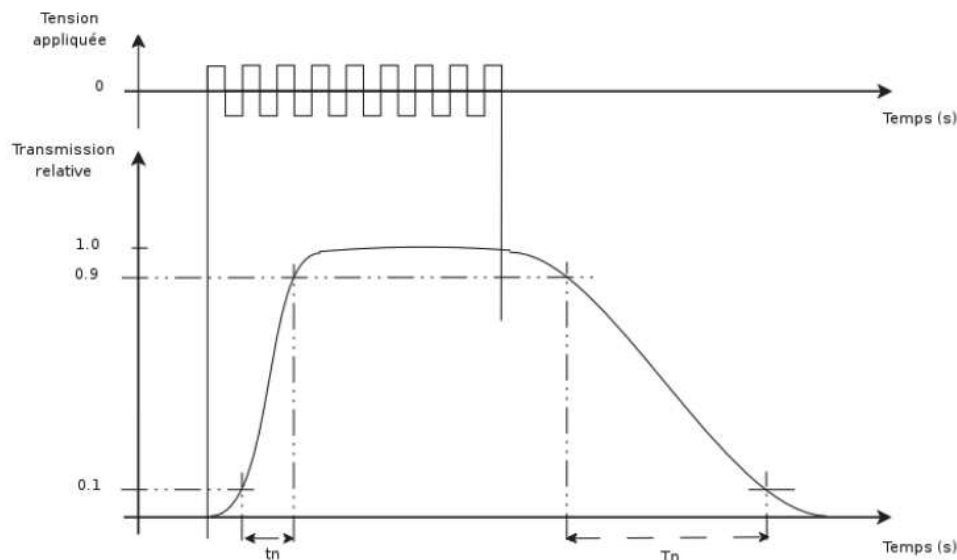


Figure 23 Réponse électro-optique temporelle d'une cellule nématique torsadée. Adapté de [109].

Plusieurs grandeurs peuvent alors être définies et notamment le temps de montée nécessaire pour que la transmission à travers la cellule passe de 10 à 90%, défini par :

$$\tau_{on} = \frac{\gamma_1}{\epsilon_0 \Delta\epsilon E^2} \quad (11)$$

Et le temps de relaxation défini par :

$$\tau_{off} = \frac{\gamma_1 d^2}{\kappa \pi} \quad (12)$$

Avec γ_1 la viscosité rotationnelle, d l'épaisseur de la cellule, ϵ_0 la permittivité du vide, $\Delta\epsilon$ l'anisotropie diélectrique du cristal liquide, E l'intensité du champ électrique appliqué à travers la cellule et K une constante regroupant les constantes élastiques du cristal liquide donnée par :

$$K = K_{11} + \frac{K_{33} - 2K_{22}}{4} \quad (13)$$

Par convention, le temps de réponse donné pour caractériser la dynamique d'une cellule nématique correspond à la somme des temps de montée et de descente soit :

$$\tau = \tau_{on} + \tau_{off} \quad (14)$$

Il est à noter que le temps de réponse en montée est plus court que le temps de relaxation, et que la montée et la descente entre 10 et 90% de transmission sont linéaires. Plus le cristal liquide aura une viscosité rotationnelle faible et plus la réponse de la cellule sera rapide. De la même façon, plus l'épaisseur de la cellule sera faible, plus la réponse dynamique de la cellule sera rapide.

La réponse temporelle à un signal électrique est une caractéristique importante des afficheurs à cristaux liquides, car des temps de réponses trop lents altèreraient la qualité de l'affichage, entraînant des enchaînements flous sur un sujet en mouvement par exemple. De nombreux travaux sont encore effectués à ce jour pour améliorer ces dynamiques de réponse, car dans les écrans, la technique d'adressage des différents pixels influe sur ce temps de réponse. Ainsi un temps de réponse de quelques ms prédit par la théorie pour un pixel augmente en fait à quelques dizaines de ms (typiquement 20-40ms) pour l'ensemble de l'afficheur, le temps de réponse croissant en \sqrt{N} , N étant le nombre de lignes de la matrice à afficher (cf. partie I.C). On peut citer plusieurs travaux récents visant à réduire les temps de réponse par l'ajout de dopant tels que de nanotubes de carbone [110] ou encore de nanoparticules de bismuth [111] dans le cristal liquide ayant pour effet supposé d'améliorer les constantes élastiques et de diminuer la viscosité du cristal liquide et qui permettent d'atteindre des temps de réponse inférieurs à la milliseconde.

Tous ces paramètres sont utilisés pour caractériser les cellules à cristaux liquides en mode nématique torsadée. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de cette partie, il existe aujourd'hui d'autres techniques utilisant une configuration différente de la couche de cristaux liquides pour l'affichage mais basées sur les mêmes principes physiques décrits ici. Parmi les plus utilisés dans l'industrie des afficheurs aujourd'hui on peut citer le mode *Super Twisted Nematic*, le mode VA *vertical alignment* ou encore le *in-plan-switching*. Ces techniques ont vu le jour notamment en raison de la nécessité de fabriquer des écrans toujours plus grands et plus performants, permettant d'adresser plus de pixels avec de meilleurs contrastes, temps de réponse ou encore un cône de visibilité plus grand [109]. Nous ne détaillerons pas ces modes d'affichage alternatifs dans ce travail de thèse car nous avons choisi d'exploiter la technique nématique torsadée, relativement facile à mettre en œuvre, très documentée car c'est la technique la plus utilisée, et celle qui possède les meilleures performances dynamiques en théorie adaptée à notre application comme nous allons le montrer dans la suite de ce chapitre.

Pour se faire une meilleure idée du fonctionnement de cellules à cristaux liquides, et des contraintes à prendre en compte pour la réalisation de notre dispositif, nous nous sommes au préalable penché sur la fabrication d'afficheurs à base de cristaux liquides dans l'industrie. Le paragraphe suivant décrit rapidement les technologies de fabrication des écrans à cristaux liquides pour mieux comprendre les difficultés et stratégies de mise en œuvre des cristaux liquides dans des dispositifs d'affichages.

C. Principe des afficheurs à cristaux liquides

1. Architecture générale

Un dispositif d'affichage à cristal liquide, aussi connu sous son abréviation anglophone LCD pour *liquid crystal display*, est constitué de différents modules de bases, dont l'assemblage fonctionnel doit permettre de produire une image pour l'observateur, c'est-à-dire une variation spatio-temporelle de luminance et de couleur. Un afficheur ou écran est constitué des éléments fonctionnels suivants (Figure 24) :

- Électronique de commande :

Le module électronique est nécessaire pour envoyer les informations des images à afficher au transducteur. De manière générale, une image peut être représentée par un ensemble de points élémentaires, les pixels, caractérisés principalement par leur emplacement dans l'image, leur luminance et leur couleur. Les signaux portant ces informations sont envoyés sous forme multiplexée pour des raisons pratiques, et traduits par le module pour les adapter à la commande du transducteur.

- Cellule transducteur :

La cellule à cristaux liquide traduit les signaux correctement conditionnés par l'électronique de commande en variation spatio-temporelle de luminance et de couleur. Les transducteurs peuvent être classés en différentes catégories selon la façon dont ils adressent leur pixel, qui dépend de la complexité de l'image à afficher. Lorsqu'il y a peu de pixel à afficher (afficheur de calculatrice par exemple), chacun peut être commandé individuellement. En revanche lorsque la cellule sert à afficher des images complexes (écran), la connectique ne permet pas d'afficher ces pixels individuellement, la cellule présentera alors une structuration particulière de l'électrode permettant l'affichage complexe de ces signaux. Ces différents types d'adressage par le transducteur de l'image pixelisée sont détaillés par la suite.

- Module d'éclairage.

Un dispositif complet de visualisation comprend un module d'éclairage, aujourd'hui majoritairement des LED. Le plus souvent, la source de lumière est située à l'arrière de la cellule, et l'observateur regarde directement en sortie du transducteur. C'est le mode le plus courant, appelé mode transmissif. Il existe aussi un mode réfléchif, pour lequel la source de lumière et l'observateur sont situés du même côté. L'unique avantage de ce mode est de pouvoir utiliser l'éclairage ambiant comme source de lumière, car pour tous les autres aspects, il est bien moins performant et donc peu utilisé. Parfois les polariseurs sont inclus dans le module d'optique, souvent ils sont déjà intégrés à la cellule électro-optique.

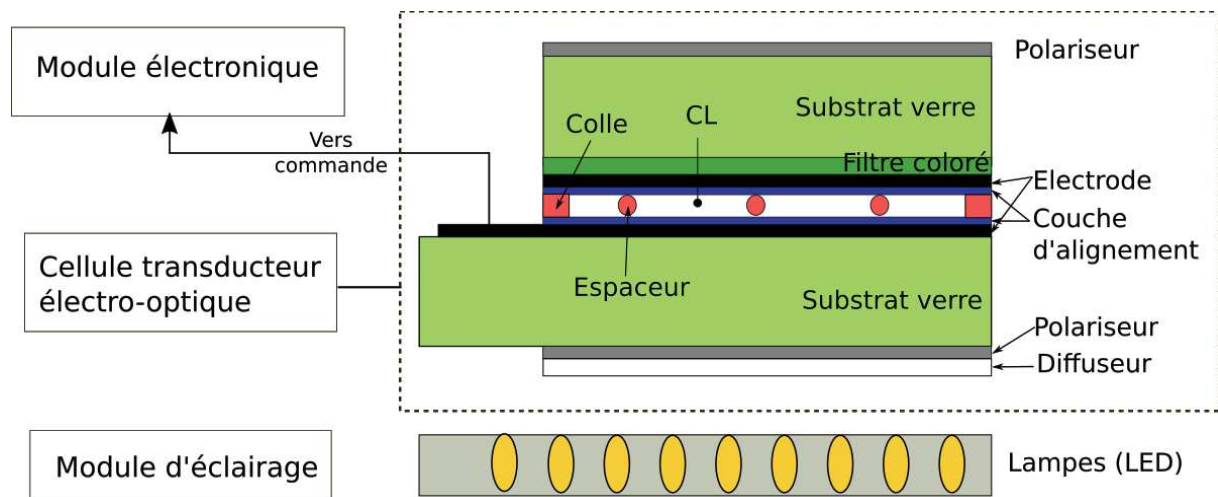


Figure 24 Schéma général d'un dispositif de visualisation. La cellule transducteur à cristaux liquides est rétro-éclairée par un réseau de lampes constituant le module d'éclairage. Elle est commandée par un module électronique qui permet de contrôler électriquement les différents pixels à afficher.

La cellule à cristaux liquides est au cœur de ce module complet de visualisation. Il existe plusieurs manières de structurer la couche de cristaux liquide pour obtenir l'effet électro-optique souhaité. Le mode TN *twisted nematic* a été décrit en détails dans la partie précédente, néanmoins, quelle que soit la configuration du cristal liquide utilisée, toutes les cellules électro-optiques présentent l'architecture commune schématisée sur la Figure 24. Deux plaques de verres servant de support sont collées l'une à l'autre par un joint périphérique, laissant place à une cavité de faible épaisseur (1 à 10 μ m) remplie des cristaux liquides. Des cales (espaceurs) peuvent être insérées pour maintenir cette épaisseur constante sur l'ensemble de la cellule. Un réseau d'électrodes transparentes est déposé sur la partie interne des deux plaques de verre, à l'intérieur de la cavité. Il existe plusieurs façons de structurer ces électrodes comme nous l'avons mentionné, selon l'image à afficher. Ce point sera discuté dans le paragraphe suivant. Dans tous les cas, les électrodes sont recouvertes des couches d'alignement chargées de donner leur structure d'équilibre aux cristaux liquides. La modification locale de la transmission de la lumière est obtenue en appliquant de l'extérieur via l'électronique de commande une tension entre un contact déporté de la plaque inférieure, et la plaque supérieure. Un champ électrique est alors créé entre les électrodes en regard et active le volume de cristal liquide situé entre ces deux zones d'électrodes. Souvent, une seule des deux électrodes est structurée avec la forme des pixels à afficher, l'autre électrode est uniforme et joue le rôle de la contre-électrode. Dans ce cas, le champ électrique est créé uniquement dans la zone sous le pixel délimité, la forte résistivité du cristal liquide limitant les lignes de champ au volume défini par la projection de la surface de l'électrode la plus petite.

2. Adressage des pixels

De manière générale, quelle que soit la technologie du transducteur, il faut pouvoir adresser tous ses pixels, c'est-à-dire qu'il faut être capable d'accéder à chaque pixel dans l'espace et dans le temps pour afficher l'information au bon endroit et au bon moment. Les cellules transducteur électro-optique peuvent être classées en plusieurs catégories selon la façon dont sont adressés les pixels. Les différents adressages sont détaillés ci-après.

- L'adressage direct

Ce type d'adressage, schématisé sur la Figure 25 (a) est utilisé pour les afficheurs présentant un nombre réduit de pixels, typiquement pour les montres ou les calculatrices par exemple. Dans ce cas assez simple, une seule des deux électrodes est structurée avec la forme des pixels à afficher (par

exemple le schéma des 7 segments permettant de créer tous les chiffres), l'autre électrode est uniforme et joue le rôle de la contre-électrode. Chaque pixel est accessible individuellement de l'extérieur par un plot de contact déporté sur le rebord de l'électrode et son activation est indépendante de celle de ses voisins. Ce mode d'affichage direct fournit un temps de réponse minimal et le meilleur contraste possible, conséquence directe du contrôle individuel des pixels. Cette méthode d'adressage est bien adaptée quand les éléments à afficher sont simples et peu nombreux, en revanche, la capacité de connexion physique et donc la quantité de pixels à afficher est limitée par la taille du dispositif ne permettant en pratique d'afficher que quelques dizaines de segments. D'autres types d'adressage doivent donc être utilisés pour des écrans plus complexes.

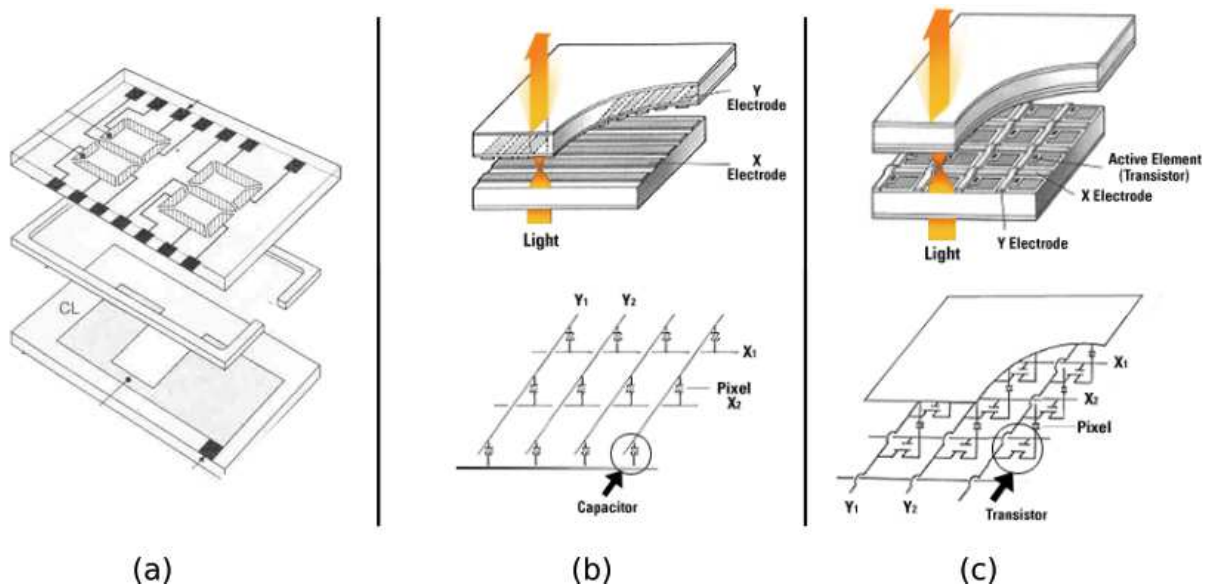


Figure 25 Schémas illustrant les différents types d'adressage possibles d'une cellule à cristaux liquides. (a) Adressage direct. L'électrode inférieure est uniforme, l'électrode supérieure est structurée des motifs à afficher. Chaque pixel est contrôlé individuellement. Adapté de [88]. (b) Adressage matriciel passif. (Haut) l'électrode inférieure est un réseau de lignes transparentes, tandis que l'électrode supérieure est un réseau de colonnes. Les pixels sont activés au croisement d'une ligne et d'une colonne. (Bas) Schéma électrique équivalent. (c) Adressage matriciel actif. (Haut) l'électrode inférieure est une matrice de transistors, l'électrode supérieure est uniforme, c'est l'électrode commune. (Bas) Schéma électrique équivalent de ce type d'adressage. Adaptés de [112].

- Adressage matriciel passif.

Dans ce cas le substrat inférieur de la matrice est structuré d'une série d'électrodes en lignes, et le substrat supérieur d'électrodes en colonnes, comme illustré Figure 25 (b). Les lignes 1 à N sont sélectionnées séquentiellement, les colonnes 1 à M reçoivent alors les signaux pour contrôler les pixels de la ligne considérée. Un pixel résulte donc de l'intersection d'une ligne et d'une colonne. Cette technique permet d'afficher beaucoup plus d'élément pour une quantité moindre de connexions, typiquement pour un afficheur composé de $M \times N$ pixels, l'organisation matricielle réduit le nombre de connexions à $M+N$, par rapport à un adressage direct. Cette technique présente en revanche des inconvénients quant au temps de réponse et au contraste de ses pixels. En effet, on a vu dans la partie précédente que les temps de réponse électrique et de relaxation d'une cellule élémentaire à cristal liquide étaient donnés par les équations (11) et (12) respectivement. Pour une matrice entière ce temps de réponse total devient proportionnel à \sqrt{N} [87]. Par conséquent il y aura un nombre limité de lignes à afficher pour garder le temps de réponse de la matrice inférieur au temps d'une trame d'images (typiquement 20ms).

Il en va de même pour le contraste. Puisque le principe de cet adressage consiste à sélectionner une ligne entière, tous les pixels de la ligne seront mis à un potentiel V_{ligne} , mais seuls les pixels de cette ligne activée par une colonne présenteront un potentiel $V_{\text{ligne}}+V_{\text{colonne}}$ et seront « allumés ». Le contraste entre un pixel simplement sélectionné et un pixel réellement activé ne sera donc pas le contraste maximal de la cellule, mais en quelque sorte une différence de niveau de gris. Ce contraste est proportionnel à $\frac{1}{\sqrt{N}}$ et décroît donc lorsque le nombre de lignes augmente.

L'adressage matriciel passif est donc mieux adapté pour l'affichage de motifs plus complexes que les simples chiffres permis par l'adressage direct, mais reste cependant limité pour un grand nombre de pixels, comme c'est le cas des écrans utilisés aujourd'hui dans les ordinateurs et téléphones par exemple. Pour cela, un autre type d'adressage est utilisé, appelé adressage matriciel actif.

- Adressage matriciel actif

Afin d'augmenter le taux de contraste et le taux de multiplexage (le nombre de lignes adressables), il faut que chaque pixel de l'image ait un champ électrique constant. Dans ce cas, le système d'électrodes transparentes lignes et colonnes est remplacé par des électrodes métalliques placées sur le même substrat, tandis que l'autre substrat de verre est recouvert d'une électrode uniforme commune, comme dans le cas de l'adressage direct. Les pixels forment une matrice où chaque pixel est contrôlé par un transistor, comme illustré sur la Figure 25 (c). Cette électrode inférieure structurée est appelée communément TFT pour *Thin Film Transistor*. Au moment de l'adressage d'une ligne, les électrodes colonnes commandent les niveaux de tension pour chaque pixel. Une fois la ligne adressée, tous les transistors de la ligne restent bloqués et gardent des niveaux constants de tension jusqu'au prochain adressage de la ligne. Ce type d'adressage qui permet de garder en permanence une tension appliquée au niveau de chaque pixel, est appelé adressage actif, ou matrice active. Les électrodes métalliques sont masquées par un réseau de lignes noires qui forment ce qu'on appelle la « *black matrix* » et qui permet de masquer d'éventuelles réflexions. La surface utile doit cependant restée prépondérante par rapport à cette zone de commande des pixels.

La Figure 26 permet de d'apercevoir la structure d'ensemble d'un écran LCD d'ordinateur moderne utilisant un adressage à matrice active et un filtre pour l'affichage des couleurs.

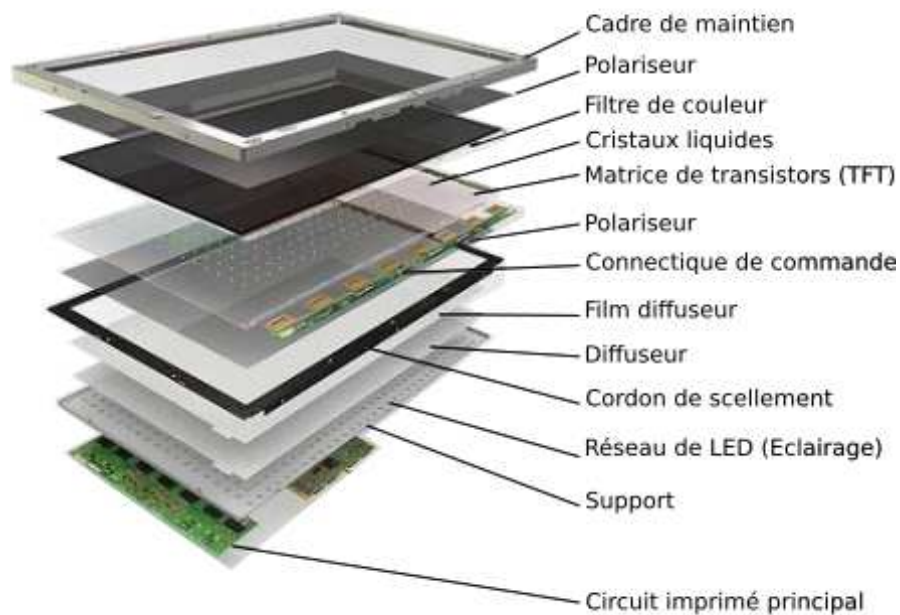


Figure 26 Vue éclatée d'un écran LCD commercial à adressage matriciel actif TFT (thin film transistor). Adapté de [112].

Conclusion de la partie I

Dans cette première partie, nous avons passé en revue les propriétés singulières des cristaux liquides, et l'exploitation de ces propriétés pour traduire un signal électrique en une variation d'intensité optique. Cet effet électro-optique est au cœur de tous les dispositifs de visualisation modernes (des afficheurs simples comme les calculatrices ou montres jusqu'aux écrans plats de télévision ou ordinateurs.) Nous avons dans un premier temps étudié ses aspects et caractéristiques théoriques à travers le mode de fonctionnement nématique tordu qui correspond à une structuration particulière des cristaux liquides pour obtenir l'effet désiré. Dans un second temps nous avons vu l'application de ce principe électro-optique à différents dispositifs d'affichage.

Cet aperçu de la structure fonctionnelle des afficheurs, et des différentes techniques d'adressage utilisées permet une meilleure compréhension des solutions technologiques élaborées en fonction des différents besoins de l'utilisateur. Nous verrons que pour la réalisation de notre dispositif, nous nous sommes inspirés de ces méthodes de visualisation utilisant les propriétés physiques singulières des cristaux liquides. Même si notre dispositif repose sur le même principe fondamental de conversion des signaux électriques en variation d'intensité optique, nous verrons que nos spécifications et besoins ne sont en revanche pas exactement identiques. En effet, si le but recherché d'un écran est l'affichage d'une image précise en contrôlant dans l'espace et dans le temps la luminosité et la position de chaque point élémentaire de l'image en lui envoyant de l'extérieure l'information électrique correspondante connue, dans notre cas l'information électrique à traduire et à afficher par le transducteur n'est pas connue puisqu'elle provient de l'activité neuronale. Cette différence fondamentale, impliquant des contraintes et spécifications nouvelles aura un impact notamment sur l'élaboration de l'ensemble du transducteur et notamment sur la façon de transmettre les signaux électriques neuronaux aux cristaux liquides. Tous ces aspects sont traités dans la suite de ce chapitre.

II. Cristaux liquides pour la détection de signaux neuronaux.

Après avoir exposé les propriétés et formalismes des cristaux liquides, ainsi que leur application aux dispositifs d'affichage, nous allons dans cette partie expliquer comment nous comptons exploiter ces aspects essentiels des cristaux liquides pour la visualisation directe de signaux électriques neuronaux. Nous verrons dans un premier temps le principe fondamental sur lequel repose le capteur électro-optique visé, inspiré des techniques exposées précédemment : nous montrerons en quoi les caractéristiques d'une cellule à cristal liquide dans la configuration nématique torsadée choisie sont adaptées à la détection des signaux électrique issus de l'activité neuronale. Nous verrons enfin les contraintes et exigences requises pour l'intégration d'un tel dispositif hybride, ainsi qu'une validation théorique du concept avancé par des modélisations basées sur la méthode des schémas électriques équivalents.

A. Principe général et spécifications du dispositif

Le principe fondamental du dispositif visé consiste à interfacier les neurones biologiques à étudier à une cellule à cristaux liquides en mode nématique torsadée capable de convertir les signaux électriques en signaux optiques selon le principe physique décrit dans la partie précédente. Les champs électriques générés par les neurones en activité viendraient réorienter localement les molécules de cristaux liquides sous-jacentes, permettant à la lumière incidente bloquée par ailleurs d'être localement transmise. Ces variations locales d'intensité optique sont recueillies sur un capteur imageur. Le principe général du dispositif ainsi que les différents éléments le constituant sont détaillés Figure 27.

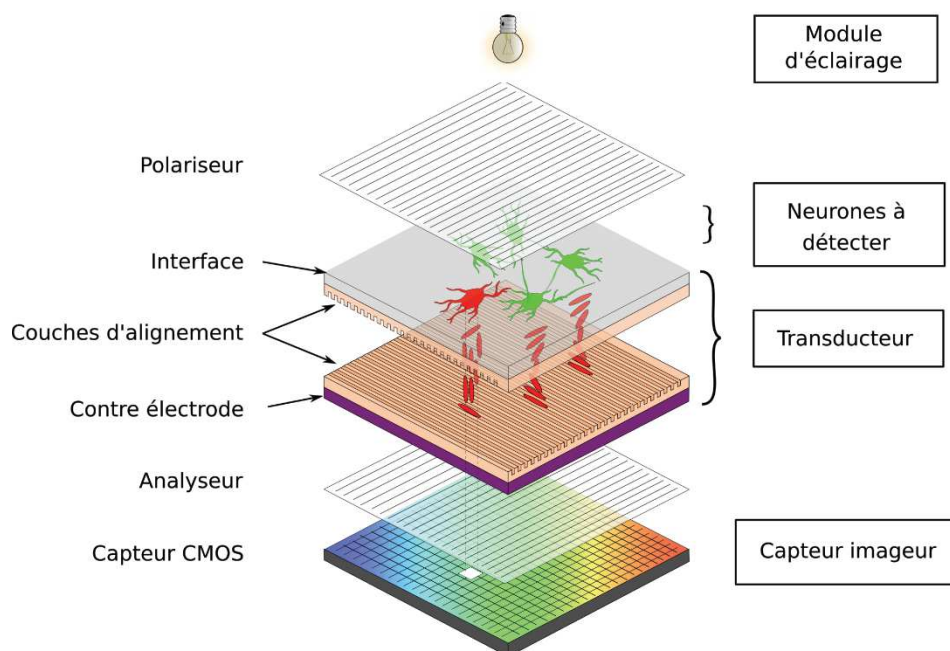


Figure 27 Principe général de détection des signaux neuronaux par le dispositif. Les neurones sont interfacés à la cellule à cristaux liquides en mode nématique torsadée. Au repos, (neurones inactifs en vert) la configuration des cristaux liquides bloque la transmission optique incidente, c'est l'équivalent du « normally black mode » (aucune lumière n'est transmise lorsqu'aucun champ électrique n'est appliqué). C'est le champ électrique généré par l'activité d'un neurone (rouge) qui provoque un changement d'alignement des molécules de cristaux liquides sous-jacentes et permet à la lumière d'être localement transmise. Le dispositif complet est composé de trois parties (i) les neurones dont il faut sonder l'activité électrique qui représente alors la grandeur physique à mesurer, (ii) le transducteur électro-optique qui grâce aux effets des cristaux liquides, convertit les champs électriques issus de l'activité neuronale en variation d'intensité optique et enfin (iii) le capteur optoélectronique qui récupère les variations d'intensité optique en sortie du transducteur pour les convertir en signal électrique analogique, lui-même traité de manière à obtenir une image numérique exploitable.

Les différents éléments constituant l'ensemble du dispositif sont détaillés ci-après, avec tout d'abord un rappel des caractéristiques des signaux neuronaux à détecter puis une revue des spécifications physiques requises en conséquence pour le transducteur et le capteur optique.

1. Les signaux neuronaux, grandeur physique à détecter

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'activité d'un neurone individuel avait la forme d'un signal intracellulaire d'une centaine de mV d'amplitude et une durée de 1 à 2ms. Ce signal individuel appelé potentiel d'action peut être enregistré *in vitro* à l'extérieur et à proximité de la cellule en activité. La valeur du signal enregistré dépend alors de la distance à la cellule, et de la technique d'enregistrement et peut varier de quelques μV à quelques centaines de μV (typiquement entre 50 et 200 μV), avec des pics occasionnels pouvant atteindre 1mV [113]. D'autres signaux électriques issus de l'activité neuronale peuvent également être enregistrés dans le milieu extracellulaire, les potentiels de champ locaux, ou LFP pour « *local field potential* ». Ces signaux résultent de la superposition de tous les phénomènes d'échanges ioniques à proximité de la zone de détection, comme par exemple des potentiels d'actions individuels générés simultanément par un agglomérat de neurones, ou encore l'activité synaptique ou celle des cellules gliales. Ces signaux ont des caractéristiques plus variables selon les contributions mises en jeu, ils ont une amplitude pouvant varier de quelques de μV à plusieurs mV (typiquement 100 μV -10mV) et une durée comprise entre 1 et 100ms [113].

Le milieu de culture dans lequel baigne les neurones est une solution ionique conductrice de conductivité électrique $\sigma = 1,38 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ qui contient les sels et nutriments nécessaires au maintien en culture des neurones à long terme.

2. Le transducteur électro-optique

Le transducteur à part entière est une cellule à cristaux liquide en configuration nématique torsadée. Nous avons vu rapidement dans la partie précédente qu'il existait d'autres modes employés pour des dispositifs d'affichage, cependant la configuration nématique torsadée est une des plus utilisée car elle permet des temps de réponse rapides, une facilité de mise en œuvre technologique, et elle est de fait largement maîtrisée et renseignée dans la littérature. Les inconvénients majeurs des cellules TN qui ont poussé au développement de mode d'affichages alternatifs sont un angle de vue restreint, et une faible possibilité d'adressage, limitant souvent leur utilisation dans des écrans, ces caractéristiques étant très recherchées dans la course à la performance et à l'accroissement des dimensions dans ce domaine. Ils impactent peu notre application car, comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre, nous n'avons pas besoin de subdiviser la cellule à cristaux liquides en pixels, une cellule uniforme est suffisante et même souhaitée, et un angle de vue optimisé n'est pas nécessaire. Nous avons donc voulu privilégier la mise en œuvre et l'accessibilité de la technique.

En ce qui concerne le choix du cristal liquide, nous avons passé en revue dans la partie précédente les propriétés physiques essentielles qui impactaient les performances de fonctionnement d'une cellule à cristaux liquide. Ainsi, la première exigence quant au cristal liquide à utiliser, est qu'il soit nématique à 37°C, température physiologique à laquelle les neurones seront maintenus pendant leur culture et l'enregistrement de leur activité. Une biréfringence optique élevée, permettant une épaisseur de la couche de cristaux liquide faible est à privilégier car elle permet des temps de réponse plus rapide. De la même manière, une forte anisotropie diélectrique est souhaitée, celle-ci influençant directement les temps de réponse et la sensibilité électro-optique de la cellule. Pour finir, plus la viscosité rotationnelle sera faible, moins le cristal liquide sera visqueux et plus les temps de réponse seront rapides. Notre choix s'est porté sur le cristal liquide composé E7 (Merck) qui est un bon compromis de tous ces critères (cf. Tableau 2) et qui est de plus un composé de référence dans la plupart des applications électro-optiques en recherche. Il est de ce fait très documenté car beaucoup étudié, ses

propriétés et constantes physiques se trouvent relativement facilement contrairement à d'autres substances, il est en revanche très coûteux (2500€/50g). Un autre cristal liquide qui possède des propriétés moins favorables en théorie que l'E7 a également été utilisé dans ces travaux de thèse, notamment pour tout le développement du transducteur qui ne nécessitent pas des performances optimales car l'enregistrement des signaux neuronaux n'était pas requis à ce stade. Ce cristal liquide simple également nématique à 37°C s'est avéré beaucoup moins onéreux que E7 (200€/100g) et a pu être acquis dès le début des travaux expérimentaux et permis le développement du transducteur. Nous n'avons pu nous procurer le cristal liquide E7 que bien plus tard. Néanmoins l'étude théorique qui va suivre utilise les propriétés de E7 en configuration nématique torsadée.

3. Le capteur optique

A terme, l'outil de visualisation chargé de récolter les variations optiques issues de l'activité du réseau de neurones étudié est basé sur une technique de microscopie sans lentille offrant une résolution spatiale du neurone individuel tout en s'affranchissant des contraintes liées au champ d'observation inhérentes aux techniques d'optique classique (microscope). De la sorte, l'observation d'une grande population de neurones devient possible sans pour autant perdre en résolution. Pour les étapes de développement de notre dispositif, nous avons opté pour le capteur utilisé actuellement dans l'équipe pour des expériences d'imagerie sans lentille. Ce dernier est un capteur CMOS, Canon EOS 1200D placé juste en dessous du transducteur pour récolter, en champ proche, les variations d'intensité optique. Les propriétés de détection de ce capteur sont résumées dans le Tableau 3 ci-dessous. Sa grande sensibilité optique (faible niveau de bruit, pour une dynamique élevée) ainsi que la taille de ses pixels ($4,3 \times 4,3 = 18,49 \mu\text{m}^2$, à comparer à la taille typique d'un neurone étalé sur un substrat plan qui est d'environ $80 \mu\text{m}^2$ si on considère un diamètre moyen de $10 \mu\text{m}$) sont d'importants atouts pour notre application. En revanche, la fréquence d'acquisition des images de ce capteur sera à terme trop lente pour détecter les signaux neuronaux. La fréquence d'acquisition est en effet située autour de 5Hz, ce qui correspond à l'enregistrement d'une image toutes les 200ms. Il est intéressant pour nous d'utiliser ce capteur pour des raisons pratiques pour les premières étapes de développement, en revanche pour la visualisation effective de l'activité des neurones biologiques, il faudra nous procurer un capteur plus performant.

Tableau 3 Caractéristiques technique du capteur CMOS utilisé.

Modèle	Taille capteur	Résolution	Taille des pixels	QE (rendement quantique)	Bruit	Dynamique
Canon EOS 1200D	14.9x22.3mm ²	3465x5202= 18M px	4,3µm x 4,3µm	37%	2,1 e ⁻	23104 e ⁻

Où e⁻ est le nombre d'électrons collectés par pixel

Nous utiliserons ces caractéristiques dans cette partie d'étude théorique du dispositif complet, cependant lors des étapes de prototypage du dispositif nous avons ponctuellement utilisé d'autres éléments de visualisation comme un microscope optique et sa caméra en sortie d'objectif, ou encore un spectromètre optique pour certaines caractérisations. Considérant que l'utilisation du capteur CMOS nécessite un certain nombre de développements et de mises au point ayant fait l'objet d'une thèse annexe et complémentaire à celle-ci d'une part et que la visualisation du réseau complet de neurones étant un objectif à plus long terme d'autre part, il n'était pas indispensable d'un point de vue pratique de l'utiliser dans ces étapes préliminaires de développement. Son intégration est néanmoins envisagée au terme de ces travaux.

L'essentiel des travaux de ce projet visait à mettre au point le transducteur électro-optique et à mettre en évidence son aptitude à détecter l'activité neuronale. De ce fait, il faut être capable d'accéder à l'aspect spatio-temporel des signaux neuronaux, ce qui soulève une série de questions fondamentales sur les caractéristiques physiques de mesure du transducteur couplé au capteur imageur :

- **Un signal de type neuronal rentre-t-il dans la gamme de mesure et au-delà du seuil du transducteur ?**
- **Dans sa gamme de mesure, le transducteur, couplé au capteur optique est-t-il suffisamment sensible pour détecter l'activité des neurones ?**
- **En ce qui concerne les caractéristiques dynamiques, la réponse temporelle de la cellule à cristaux liquides est-elle suffisamment résolue ?**
- **Enfin d'un point de vue pratique, comment transmettre localement les champs électriques issus de l'activité neuronale à la couche de cristaux liquides ?**

En définitive, les caractéristiques de la cellule à cristaux liquides couplées à celle du capteur optique sont-elles capables de détecter les signaux neuronaux ? Nous tenterons de répondre à ces questions en traitant chacun des points clés soulevés ci-dessus dans la partie suivante.

B. Caractéristiques de détection du dispositif

Nous allons tenter d'évaluer les caractéristiques de fonctionnement de notre dispositif et leur compatibilité pour la détection de signaux neuronaux.

1. Gamme de fonctionnement

Nous venons de voir dans la partie précédente qu'une cellule à cristaux liquides présente un seuil de fonctionnement en deçà duquel le champ électrique appliqué à la cellule n'est pas suffisant pour réaligner les molécules et transmettre la lumière. Ce seuil se situe en moyenne selon le cristal liquide et la configuration utilisée entre 1 et 4V. Or, l'amplitude des signaux neuronaux extracellulaires est typiquement de l'ordre du mV voire du μV . Se pose alors la question du franchissement de cette tension seuil et du placement dans la gamme de fonctionnement optimale de la cellule à cristaux liquides ? Pour contourner cette première problématique, la solution proposée consiste à baigner les neurones dans leur milieu de culture (un conducteur ionique) dans un champ électrique alternatif global, qui permet un premier réalignement partiel de tous les cristaux liquides d'un certain angle par rapport à l'horizontal et décale ainsi l'ensemble de la cellule dans sa gamme de sensibilité. De plus, il a été montré [114] qu'un champ électrique alternatif n'endommage pas les cellules neuronales ni n'altère leur activité pour des fréquences supérieures au KHz. Le principe du concept avancé est illustré en détail sur la Figure 28.

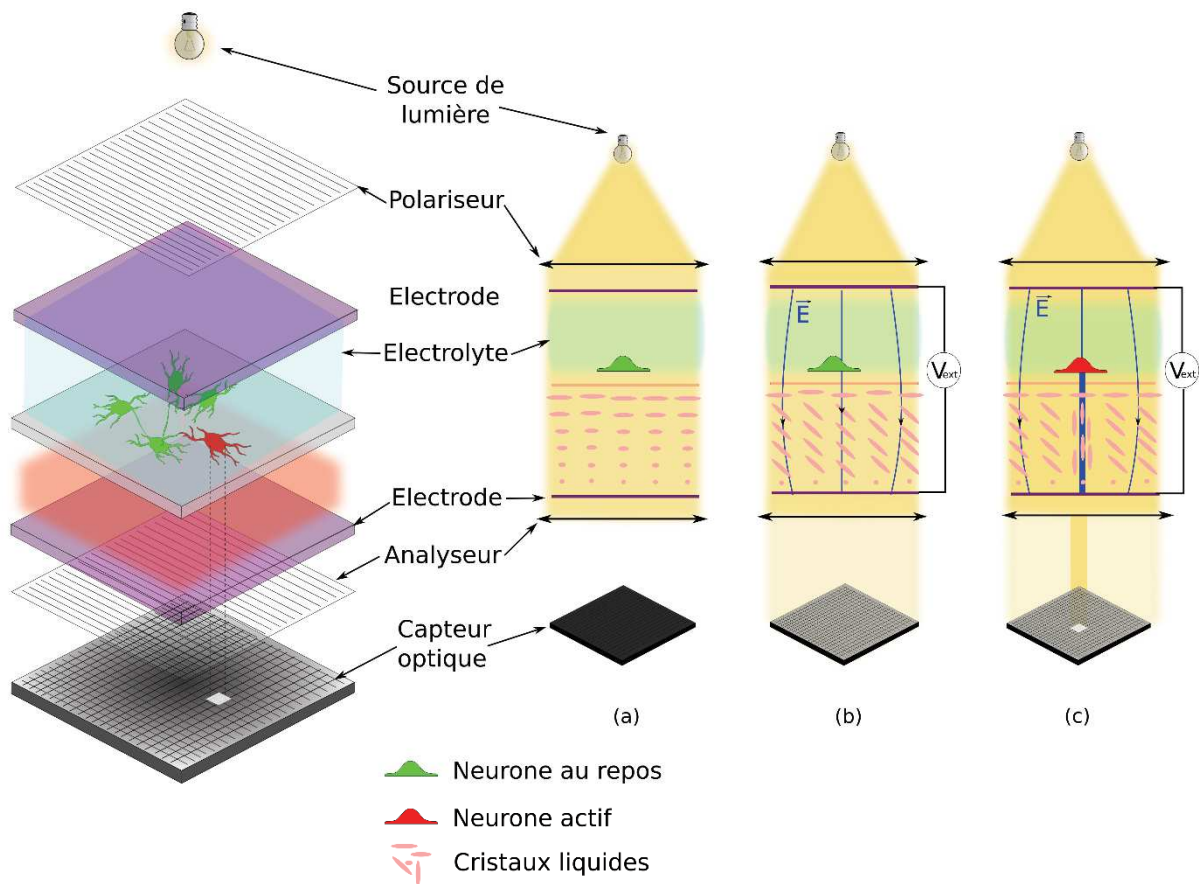


Figure 28 Principe physique de détection de signaux neuronaux par le dispositif dans la configuration réelle d'application d'un champ électrique extérieur. Vue schématique en 3D de l'ensemble du dispositif (gauche) et les trois cas de figure explicitant son fonctionnement. (a) Les neurones dans leur milieu de culture, une solution conductrice ionique sont interfacés au transducteur. Au repos et sans aucun champ électrique appliqué dans l'électrolyte, le transducteur électro-optique en configuration nématique torsadée tourne la polarisation de la lumière incidente polarisée linéairement par le premier polariseur d'un angle de 90° , la lumière en sortie du transducteur est totalement absorbée par l'analyseur en sortie et aucune lumière n'est transmise jusqu'au capteur optique, éteint. (b) L'application d'un champ électrique extérieur d'une amplitude V_{ext} comprise entre V_{10} et V_{90} dans le milieu de culture des neurones permet de réorienter partiellement les molécules de cristaux liquides sur l'ensemble de la surface du transducteur, et de laisser ainsi passer une partie de la lumière incidente récoltée en sortie sur le capteur optique. (c) Le champ électrique localement généré par un neurone en activité (en rouge) impose une réorientation plus importante des molécules de cristaux liquides sous jacentes, transmettant ainsi localement sous le neurone en activité plus de lumière qu'ailleurs. Cette variation locale d'intensité lumineuse est captée en sortie.

L'application de ce champ électrique extérieur permet de dépasser le seuil de détection de la cellule à cristaux liquides et de se placer dans sa gamme optimale de sensibilité, jouant sur les niveaux de gris de la lumière transmise.

2. Sensibilité

La sensibilité du dispositif global et sa capacité à détecter un signal de la valeur d'un potentiel d'action est déterminé par la sensibilité du transducteur combiné à celle du capteur optique. Une fois dans la gamme de fonctionnement de la cellule à cristal liquide, la plus petite variation de potentiel détectable dépend directement de la sensibilité du transducteur, relative à sa raideur électro-optique (pente de la partie linéaire de sa caractéristique électro-optique) et de la sensibilité du capteur optique. Se pose alors la question de la plus petite variation de champ électrique qui génère une différence de transmission optique à travers le transducteur capable d'être détectée par le capteur ? Est-elle compatible avec la valeur d'un potentiel d'action ?

Calculons d'abord la sensibilité minimale du capteur optique. Celle-ci peut être déterminée grâce aux paramètres fournis par le constructeur. Le signal minimal détectable par pixel (le seuil du bruit) est de 2,1 électrons et le signal maximal qui peut être reçu par un pixel avant saturation est de 23104 électrons, ce qui correspond d'après le rendement quantique de 37% à un seuil de bruit de 5,67 photons par pixel et une saturation du pixel à 62443 photons. La plus petite variation d'intensité lumineuse détectable par le capteur pour un pixel donné est alors définie par :

$$\Delta I_{min} = \frac{Résolution_{min}}{Dynamique_{max}} = 0,0091 \% \quad (15)$$

Cela signifie que le capteur sera capable de détecter une variation d'intensité spatio-temporelle de 0,0091% entre un pixel et son voisin, ou entre un instant t et t+1.

Intéressons-nous maintenant à la variation de transmission optique que cause localement un neurone en activité interfacé au transducteur, défini théoriquement par la courbe électro-optique de la transmission en fonction du champ électrique extérieur de la cellule à cristaux liquide. Une fois le champ électrique global appliqué permettant de décaler le potentiel vu par les cristaux liquides dans la pente de sensibilité de la courbe, une variation locale du potentiel induite par l'activité des neurones cause une intensification de la lumière transmise ΔT , comme illustré Figure 29.

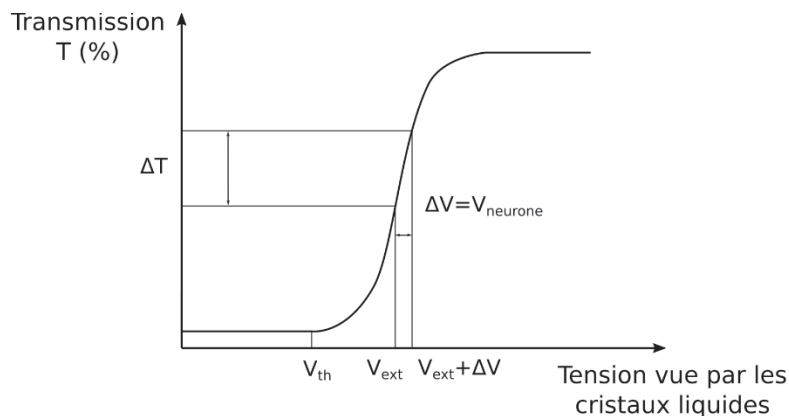


Figure 29 Courbe électro-optique typique illustrant le principe de détection d'une variation locale de potentiel causé par un signal neuronal, une fois la cellule à cristaux liquides placée dans sa gamme de sensibilité optimale grâce à l'application d'un champ électrique extérieur V_{ext} .

Dans le cas concret du cristal liquide E7 en configuration nématique tordu, la partie linéaire de la courbe électro-optique est défini par les valeurs $V_{10}=1,41$ V et $V_{90}=1,99$ V. Ces valeurs ne sont pas prédictibles par la théorie, mais sont renseignées par le fournisseur (Merck) et seront prises comme valeurs de référence.

La pente de cette droite est alors définie par :

$$a = \frac{\Delta T}{\Delta V} = \frac{T_{90} - T_{10}}{V_{90} - V_{10}} = \frac{90\% - 10\%}{1,99 - 1,41} \approx 1,38 \quad (16)$$

Dans le cas de potentiels d'action (PA), un signal extracellulaire de l'ordre de 100 μ V est créé à proximité du neurone induisant une variation $\Delta V=100\mu$ V, ce qui correspond à un contraste d'intensité transmise théorique $\Delta T_{(PA)}=0,0138$ %. Cette valeur est supérieure au minimum détectable par le capteur optique ($\Delta I_{min}=0,0091\%$). Pour les potentiels de champ locaux (LFP), l'amplitude du signal détecté en extracellulaire est de l'ordre de quelques centaines de μ V et peut aller jusqu'à plusieurs

mV. Prenons une valeur moyenne de 1mV pour l'exemple, qui entraîne une variation d'intensité transmise de $\Delta T_{(LFP)}=0,138\%$, soit un ordre de grandeur supérieur au seuil théorique de détectabilité du dispositif. De façon similaire, la plus petite valeur de variation de potentiel détectable par le dispositif pour le capteur utilisé lorsque les cristaux liquides utilisés sont le E7 a été calculée et trouvée égale à $66\mu V$.

Le dispositif composé de la cellule à cristaux liquides en configuration nématique torsadée jouant le rôle de transducteur et du capteur optique est donc en théorie capable de détecter les signaux électriques neuronaux extracellulaire individuels (PA) et collectifs (LFP). Même si la grandeur physique la plus faible à détecter ($\sim 100\mu V$) est proche de la limite basse de détection (de l'ordre de $66\mu V$) pour ce capteur et ce type de cristal liquide, il peut être aisément envisagé d'optimiser ces caractéristiques en utilisant un capteur optique plus sensible, ou encore un cristal liquide avec une raideur électro-optique (pente) plus importante. Des mélanges de cristaux liquides présentant des raideurs électro-optique élevées sont en effet de plus en plus synthétisés car cette caractéristique est très recherchée pour les applications d'affichage procurant de meilleurs contrastes et une plus grande capacité d'adressage [90],[91]. Par exemple, $V_{90}-V_{10}<0,1V$ pour certains mélanges, ce qui dans notre application donnerait un signal minimum détectable $\Delta V_{\min}=11\mu V$ pour le même capteur. Ces cristaux liquides sont en revanche plus coûteux et ne sont pas indispensables à cette étape de développement du dispositif, une marge de manœuvre est néanmoins possible pour une optimisation ultérieure.

3. Réponse dynamique

La capacité du dispositif à résoudre temporellement les signaux neuronaux est déterminée par la réponse dynamique du transducteur à cristaux liquides. Les temps de réponses théoriques d'une cellule en configuration nématique torsadée simple ont été donnés en amont par les équations (12),(13) et (14). Si on applique ces formules pour calculer les temps de réponses théoriques qu'il faut pour qu'une cellule E7 en configuration nématique torsadée passe de T10 à T90 (τ_{on}) puis de T90 à T10 (τ_{off}), sans le champ électrique global extérieur, alors on obtient :

$$\tau_{on(10-90)} = \frac{\gamma_1}{\varepsilon_0 \Delta \varepsilon E^2} = \frac{166[mPa.s]}{8,85 \cdot 10^{-12}[F.m^{-1}] \times 14,3 \times (1,5 \cdot 10^6)^2[V.m^{-1}]^2} = 5,83 \cdot 10^{-4} s \quad (17)$$

Soit 0,583ms pour le temps de réponse en montée et :

$$\tau_{off(90-10)} = \frac{\gamma_1 d^2}{\kappa \pi^2} = \frac{166[mPa.s] \times 2[\mu m^2]}{10,215[pN] \times \pi^2} = 6,58 \cdot 10^{-3} s \quad (18)$$

Soit 6,58ms pour le temps de relaxation. Le temps de réponse total de la cellule simple est donc $\tau = 7,163ms$. Ces valeurs correspondent au temps nécessaire pour que les molécules de cristaux liquide se réorientent parallèlement au champ électrique et permettent ainsi que la transmission de la lumière passe de 10% à 90% de l'intensité totale pouvant être transmise quand la valeur du champ électrique appliqué correspond à une transmission maximale, soit $V > V_{90}$. On applique ici $V=3V$ ($>V_{90}=1,99V$), ce qui correspond à un champ électrique $E=1,5\mu V.m^{-1}$ sur l'épaisseur de la cellule. L'épaisseur de la cellule nématique torsadée avec le cristal liquide E7 est donné par l'équation (7) $d = \frac{\lambda\sqrt{3}}{2\Delta n}$ soit $d=2,1\mu m$.

Cependant il faut prendre en considération la configuration réelle du dispositif dans les conditions d'enregistrement des signaux neuronaux, c'est-à-dire considérer le champ électrique alternatif global appliqué en permanence aux bornes de la cellule pour se placer dans la gamme de sensibilité de cette dernière. En effet les molécules de cristaux liquides auront déjà subi une réorientation partielle sous

l'effet de ce champ extérieur et laissent passer une certaine quantité de lumière (comprise entre 10 et 90% selon la valeur de V_{ext} appliquée). Le temps de réponse du dispositif dans cette configuration à un signal de type signal neuronal correspond donc au temps qu'il faudra aux molécules pour passer du potentiel V_{ext} appliqué à $V_{ext}+V_{neurone}$. Cette variation de potentiel vue par la couche de cristaux liquide s'accompagne d'une variation d'intensité lumineuse transmise à travers le transducteur qui a été calculée dans le paragraphe précédent pour les deux types de signaux neuronaux ($\Delta T=0,0138\%$ pour les potentiels d'action, et $\Delta T=0,069\%$ pour les LFP). La transmission de la lumière à travers la cellule à cristaux liquides varie linéairement avec le temps (cf. Figure 23). Le temps de montée du transducteur en réponse à un signal de type potentiel d'action peut alors être estimé par :

$$\tau_{on(PA)} = \frac{\Delta T_{(PA)} \times (\tau_{on})_{90-10}}{\Delta T_{90-10}} = 1,0. 10^{-7}s \quad (19)$$

Soit 100 ns.

Le temps de relaxation pour ramener les molécules de cristal liquide à leur orientation d'équilibre sous le potentiel V_{ext} après un potentiel d'action est donné par :

$$\tau_{off(PA)} = \frac{\Delta T_{(PA)} \times (\tau_{off})_{90-10}}{\Delta T_{90-10}} = 1,13. 10^{-6}s \quad (20)$$

Soit 1,13 μs . On rappelle que la durée caractéristique d'un potentiel d'action individuel est de 1 à 2 ms. Le temps de réponse du transducteur à la montée est assez court pour que la variation optique soit visible en sortie, puisque τ_{on} est 10^4 fois inférieur à la durée du phénomène à mesurer. Le temps de relaxation, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que les molécules de cristaux liquides retrouvent leur position d'équilibre sous le champ électrique extérieur après avoir pivoté sous l'effet du signal neuronal est quant à lui 10^3 fois plus court que la durée typique du potentiel d'action. Le comportement dynamique en montée et en descente du transducteur s'avère donc suffisamment rapide pour permettre de répondre à un potentiel d'action individuel.

En appliquant le même raisonnement pour les potentiels de champ locaux (LFP), on trouve $\tau_{on(LFP)} = 5,03. 10^{-7}s$, soit 503 ns et $\tau_{off(LFP)} = 5,67. 10^{-6}s$ soit 5,67 μs . Ces temps de réponse sont également assez courts pour résoudre temporellement un signal de type potentiel de champ local (LFP), qui a une durée moyenne comprise entre 10 et 100ms.

Nous avons montré qu'avec un cristal liquide commun dont les propriétés intrinsèques sont avantageuses mais pas nécessairement optimisées, il est en théorie possible de détecter des signaux neuronaux à condition de placer l'ensemble du transducteur dans un champ électrique extérieur qui décale le potentiel vu par les cristaux liquides dans leur gamme de sensibilité optimale, au-delà du potentiel seuil. La dynamique du transducteur avec le cristal liquide choisi (E7) est suffisamment rapide pour répondre à la caractéristique temporelle des signaux neuronaux, que ce soit le potentiel d'action ou les potentiels de champ locaux. De plus, l'étude a été menée avec les propriétés physiques théoriques de E7, renseignées dans la littérature pour des valeurs de température ambiante $T=20^\circ C$. Or certaines de ses propriétés dépendent justement de la température du cristal liquide comme notamment la viscosité. Cette dernière a tendance à fortement diminuer avec l'accroissement de la température, réduisant ainsi davantage les temps de réponse pour des températures de travail $T>20^\circ C$, ce qui sera le cas à terme dans nos conditions expérimentales (température des neurones en culture fixée à $37^\circ C$).

4. Interface neurones/cristaux liquides

Le dernier point clé soulevé concerne l'interface entre les neurones et la couche de cristaux liquides. **Comment transmettre les signaux neuronaux à la cellule à cristaux liquides ?**

On a vu précédemment que les LCD ou écrans à cristaux liquide contrôlaient individuellement chaque pixel de l'écran grâce à une électrode supérieure découpée en matrice de transistors. Cet empilement tel qu'on le trouve actuellement dans l'industrie ne nous permet en aucun cas de récolter l'activité spatio-temporelle d'un réseau de neurones et ce pour plusieurs raisons. D'une part cette électronique de commande n'est pas compatible avec la partie fluide dans laquelle doivent impérativement baigner les cellules. D'autre part l'électrode supérieure structurée doit être fabriquée sur un substrat, transparent, souvent en verre, qui, de par sa nature isolante, isolerait électriquement les neurones du reste du dispositif empêchant de la sorte d'accéder à leurs signaux. Enfin, une telle discrétisation de l'électrode supérieure conduirait aux mêmes inconvénients majeurs que ceux des réseaux de microélectrodes ou de transistors utilisés actuellement pour la détection de l'activité neuronale. Les matrices de microélectrodes ou de transistors ne permettent en effet pas de contrôler spatialement le positionnement d'un neurone unique sur une unique électrode (plusieurs neurones se retrouvent sur une même électrode, ou des neurones n'ont pas d'électrodes sous-jacente), ou nécessitent pour palier à cette distribution aléatoire du réseau une structuration de surface de la zone de détection pour promouvoir l'adhésion des cellules sur les sites voulus, perturbant ainsi en partie le développement du réseau de neurones. Ajouter à cela l'électronique de commande des électrodes ou transistors, qui devient complexe à mesure que leur nombre augmente.

De plus, dans le cas d'un LCD, le contrôle individuel de chaque pixel est le cœur de fonctionnement puisque le but est d'afficher une image correspondant à la variation d'intensité de chaque pixel à l'instant t. Dans notre cas en revanche, ce sont les neurones qui jouent en quelque sorte le rôle de l'électrode supérieure discrétisée contrôlant les variations spatiales d'intensité.

Pour récolter directement cette variation spatio-temporelle issue de l'activité du réseau de neurones, il faut alors pour compléter le dispositif une couche interfaciale capable de répondre aux critères suivants :

- Transmettre localement et « verticalement » les signaux électriques des neurones vers la couche sous-jacente de cristaux liquides.
- Être suffisamment transparente optiquement de manière à récolter les variations d'intensité optique sur le capteur imageur sans atténuation majeure.
- Assurer l'alignement des molécules de cristaux liquides : elle doit être suffisamment rigide et plane pour permettre de disposer d'une épaisseur uniforme et homogène de cristaux liquides et de garantir leur alignement.
- Enfin, elle doit être compatible biologiquement avec les neurones et permettre leur viabilité pendant les durées pertinentes pour les observations courantes en neurosciences (typiquement une durée de 14 jours est requise pour atteindre la maturité des neurones utilisés dans notre application).

Pour cela, deux possibilités s'offrent à nous :

- La première, très intuitive, consiste à s'orienter vers des matériaux électriquement conducteurs mais d'une façon mono-directionnelle (ou anisotrope). Il faut en effet, pour les besoins d'organisation de cristaux liquides, que les signaux électriques soient transmis « verticalement » des neurones à la couche sous-jacente de cristaux liquides en évitant tout phénomène de *cross-talk* latéral entre neurones voisins. Ce confinement vertical est

indispensable car il est directement issu du principe de fonctionnement de notre dispositif où le but recherché est une détection des neurones à l'échelle individuelle.

- La deuxième possibilité consiste à élaborer cette couche d'interfaçage dans un film, non conducteur, homogène et uniforme à condition que ce film soit suffisamment mince pour ne pas écranter le champ électrique émis par les neurones et garantir la transmission locale des signaux neuronaux aux cristaux liquides.

Des simulations basées sur des modèles électriques équivalents ont été menées pour appréhender le comportement électro-optique de l'ensemble du dispositif incluant cette interface et sont présentées ci-après.

C. Modèle électrique équivalent du neurone couplé au transducteur

1. Présentation du modèle

La structure du dispositif ainsi que le schéma électrique équivalent le modélisant sont représentés sur la Figure 30, selon les deux cas de figures relatifs aux deux interfaces possibles. Ce système hybride peut être découpé en quatre parties pour simplifier la modélisation :

- (i) Le neurone dans son milieu de suspension, étant soit au repos, soit présentant une activité de type potentiel d'action. Cette partie comprend également l'espace formé entre le neurone et l'interface.
- (ii) L'interface neurone / cristaux liquides chargée de transmettre localement les signaux électriques du neurone actif à la couche de cristaux liquides qui peut être soit un conducteur anisotrope, soit un diélectrique mince.
- (iii) Les cristaux liquides confinés en couche mince selon une configuration nématique torsadée et changeant d'orientation pour s'aligner avec le champ électrique lorsque celui-ci s'intensifie localement sous un neurone actif.
- (iv) Une source de tension extérieure appliquée à l'ensemble du dispositif directement dans la solution ou le tissu afin d'atteindre la tension seuil nécessaire et placer les cristaux liquides dans leur gamme de sensibilité.

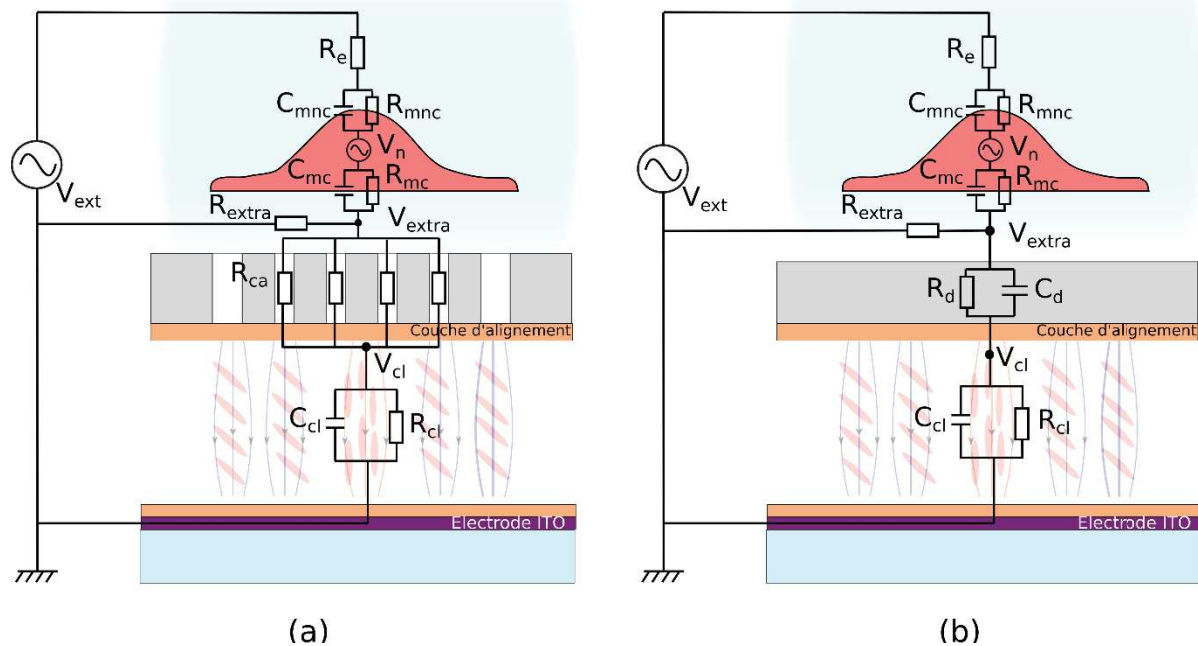


Figure 30 Schéma décrivant l'empilement et la disposition spatiale d'un neurone interfacé au transducteur à cristaux liquide et schéma électrique équivalent pour deux cas de figures : (a) l'interface entre le neurone et la cellule à cristaux liquide est un ensemble de conducteurs verticaux encapsulés dans une matrice isolante (b) l'interface est un diélectrique uniforme. Le neurone (rouge) dans son milieu de culture est interfacé au transducteur électro-optique. La membrane neuronale est divisée en deux, la partie inférieure en contact avec l'interface, représentée par une résistance R_{mc} associée en parallèle avec un condensateur de capacité C_{mc} et la partie supérieure tournée vers le milieu de culture, représentée par sa résistance R_e . La portion de membrane non contactée au substrat est également représentée par une résistance R_{mnc} en parallèle d'un condensateur C_{mnc} . La solution physiologique dans l'espace interstitiel entre le neurone et l'interface est modélisée par une résistance R_{extra} , reliée à la masse. Le potentiel extracellulaire sous le neurone en activité est noté V_{extra} . Une différence de potentiel V_{ext} est appliquée entre le milieu de culture et l'électrode inférieure du transducteur afin d'augmenter la tension effective vue par les cristaux liquides V_{cl} .

Lorsqu'une cellule neuronale adhère à un substrat, il se forme naturellement un interstice entre la cellule et le substrat Cet espace est rempli du liquide ionique dans lequel baignent par ailleurs les neurones. Lorsqu'un neurone est actif, des ions sont échangés à travers la membrane entre le milieu intracellulaire et le milieu extra cellulaire. Ce déplacement collectif de charges crée un courant I_{extra} qui circule dans l'interstice de résistance R_{extra} , générant localement une différence de potentiel V_{extra} entre cet interstice et le reste du milieu de culture. Les cristaux liquides sous-jacents voient ce changement de potentiel local après atténuation par l'interface sur laquelle repose les neurones. Ce potentiel vu par la couche de cristaux liquide est alors noté V_{cl} . Un champ électrique d'amplitude V_{ext} est appliqué dans le bain de culture des neurones pour placer l'ensemble de la couche de cristaux liquide dans sa gamme de sensibilité.

Le choix des composants électriques modélisant le comportement physique de chaque partie du système et leur disposition telle qu'elle est représentée sur le schéma équivalent est détaillé et justifié ci-après.

(i) Le neurone

Toutes les cellules neuronales présentent un potentiel de repos qui correspond à un équilibre de charge entre leur milieu intra et extracellulaire de part et d'autre de la membrane plasmique. Un potentiel d'action est généré par un flux d'ions K^+ et Na^- rentrant et sortant de la cellule à travers les canaux ioniques membranaires correspondant, provoquant une dépolarisation locale de la membrane, soit un déséquilibre de ces charges qui se propage ensuite de proche en proche.

Pour simuler ce comportement d'un point de vue électronique, la plupart des modèles adoptent une approche à l'échelle moléculaire basée sur la première description mathématique faite par Hodgkin et Huxley [115]. Ce modèle décrit le comportement électro-physiologique d'une portion de membrane et associe à chaque espèce ionique un canal de conduction de résistance variable, en série avec un générateur modélisant l'effet de pompe ionique. Ces canaux, eux même associés en parallèle les uns des autres, sont associés en dérivation avec un condensateur imitant l'effet capacitif de la membrane. Plusieurs travaux ont ensuite tenté d'améliorer ou de compléter ce modèle de base soit d'un point de vue mathématique[116], soit d'un point de vue physiologique [117][118]. La tendance de travaux récents visant à interfacier les cellules neuronales à tous types de substrats afin d'en sonder l'activité ont fait naître des modèles adoptant une approche plus globale, prenant en compte le comportement électrique d'une cellule dans son ensemble, ainsi que son interaction avec la zone de détection du substrat. Dans le modèle de Fromherz [119], le comportement électro physiologique de la membrane est simplifié par une capacité C en parallèle avec une résistance R , les deux armatures du condensateur représentant les milieux intra et extracellulaire et la résistance modélisant le flux d'ions à travers les canaux ioniques. Il distingue en revanche deux zones membranaires, la partie en contact avec le substrat, et la partie supérieure tournée vers le milieu de culture. L'activité du neurone est simulée par un générateur placé dans le milieu intracellulaire. Celui-ci est allumé et délivre un signal alternatif caractéristique d'un potentiel d'action ($V \sim 100\text{mV}$) lorsque le neurone est actif. Il est éteint ($V=0$), lorsque le neurone est au repos. Ce modèle a été proposé par Fromherz, dans ces travaux associant des neurones à une puce de silicium. Il a été repris de nombreuses fois par la suite pour décrire le comportement de neurones interfacés à tout type de substrats, aussi bien des MEAs [70],[120],[121], que des transistors à effet de champ [122],[123],[124] utilisés pour la détection de l'activité neuronale.

C'est aussi le modèle que nous avons choisi d'utiliser dans le cadre de cette étude : la partie de la membrane en contact avec l'interface étant représentée par une capacité C_{mc} en parallèle avec une résistance R_{mc} , la partie supérieure de la membrane qui n'est pas en contact avec le substrat est représentée par C_{mnc} en parallèle avec R_{mnc} . Les annotations « mc » et « mnc » ont été choisies pour membrane en contact, et membrane non contactée, respectivement. L'activité du neurone est représentée par le générateur V_n qui délivre un potentiel intracellulaire, correspondant à un potentiel extracellulaire V_{extra} localisé sous la cellule.

Les neurones sont maintenus sur le dispositif dans leur milieu de culture, contenu dans un puits souvent élaboré en PDMS. Le milieu de culture est une solution ionique de conductivité $\sigma=1,38 \text{ S.m}^{-1}$. La résistance associée à ce liquide conducteur dépend de la géométrie du puits et de la conductivité du milieu et est donnée par :

$$R_e = \rho \frac{l}{A} \quad (21)$$

Où $\rho = \frac{1}{\sigma}$ est la résistivité du milieu de culture utilisé, l est la hauteur du puit, et A sa surface.

(ii) L'interface neurones/cristaux liquides

- Interface anisotrope

Dans le cas où l'interface est un réseau régulier de conducteurs ou semi-conducteurs cylindriques verticaux encapsulés dans une matrice isolante, le comportement électrique de chaque cylindre est décrit par une résistance R_c dépendant de sa géométrie (longueur l et rayon r_c) et de la résistivité du matériau utilisé.

$$R_c = \rho \frac{l}{A} = \rho \frac{l}{\pi r_c^2} \quad (22)$$

En assumant que la surface du neurone en contact avec cette interface est un disque de rayon r_n , le nombre de cylindres connectés au neurone étudié et sollicités pour transmettre localement le signal électrique de ce neurone actif à la couche de cristaux liquides est donné par :

$$n = \frac{r_c(4 - 2\sqrt{2}) + 2e + 2\sqrt{2}r_n}{4r_c + 2e} \quad (23)$$

Où r_c est le rayon d'un cylindre, e est l'espacement entre chaque conducteur cylindrique du matériau anisotrope et r_n est le rayon du neurone.

On définit R_{ca} la résistance équivalente de l'ensemble de ces n nanofils conducteurs connectés en parallèle au neurone étudié, en négligeant l'effet capacitif causé par les interstices isolants.

$$R_{ca} = \frac{R_c}{n} \quad (24)$$

- Interface homogène

Dans le cas où l'interface est un diélectrique mince, elle peut être modélisée par un condensateur plan de capacité :

$$C_d = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r S}{d} \quad (25)$$

En parallèle avec une résistance R_d .

ϵ_0 étant la permittivité du vide, ϵ_r la permittivité relative du matériau diélectrique utilisé, S la surface de l'interface et d l'épaisseur du matériau.

(iii) Les cristaux liquides.

Dans la plage de fréquence pour laquelle l'anisotropie diélectrique du cristal liquide reste constante typiquement comprise entre une dizaine de Hz et 10KHz, une cellule à cristaux liquides E7 en configuration nématique twistée peut-être modélisée par un condensateur C_{lc} en parallèle avec une résistance R_{cl} [125],[126],[127].

(iv) Source de tension extérieure

Finalement, le champ électrique extérieur appliqué à l'ensemble du dispositif est une source de tension alternative AC, délivrant un signal carré de fréquence $F=1\text{KHz}$ et d'amplitude V_{ext} comprise entre V_{10} et V_{90} .

2. Influence des propriétés de l'interface

Sur la base de ce modèle électrique équivalent, et en gardant comme objectif général la réalisation future d'un dispositif réel, nous avons étudié l'influence des paramètres géométriques et des propriétés physiques intrinsèques des deux interfaces possibles. Les simulations ont été menées grâce au logiciel MATLAB. Pour cela, nous nous intéressons en paramètre de sortie à la variation d'intensité optique ΔT en sortie du dispositif entre l'état actif V_{on} (neurone traversé par un potentiel d'action) et l'état d'équilibre V_{off} (neurone au repos). Nous avons choisi de ne considérer que les signaux de types

potentiels d'action ($F=100\text{Hz}$, $V_{\text{intra}}\sim 100\text{mV}$, $V_{\text{extra}}\sim 100\mu\text{V}$) car les potentiels de champs locaux comme nous l'avons déjà mentionné auparavant sont des signaux qui peuvent provenir de plusieurs neurones synchrones, ou des contributions multiples de plusieurs phénomènes (activité synaptique, activité des cellules gliales, etc.) et sont beaucoup plus difficiles à modéliser.

La démarche suivie pour ces simulations est la suivante : on exprime d'abord en fonction de tous les autres paramètres V_{cl} la tension vue par la couche de cristaux liquides pour chacun des deux états (actif ou au repos) du neurone. V_{cl} est donné par :

$$V_{\text{cl}} = \frac{Z_{\text{cl}}(V_{\text{ext}} + V_n)(Z_{\text{mc}} + Z_{\text{mnc}} + R_{\text{extra}}) - R_{\text{extra}}V_n}{Z_{\text{cl}}(Z_m + Z_{\text{mnc}} + R_{\text{extra}}) + (Z_m + R_{\text{extra}})(R_e + Z_{\text{interface}}) + R_{\text{extra}}Z_m} \quad (26)$$

Avec Z_{cl} le module de l'impédance équivalente à l'ensemble de la couche de cristaux liquides :

$$Z_{\text{cl}} = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{R_{\text{cl}}^2} + (C_{\text{cl}}\omega)^2}} \quad (27)$$

Z_{mc} l'impédance équivalente à l'association en parallèle de R_{mc} et C_{mc} respectivement la résistance et la capacité de la membrane du neurone en contact avec le substrat :

$$Z_{\text{mc}} = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{R_{\text{mc}}^2} + (C_{\text{mc}}\omega)^2}} \quad (28)$$

de façon similaire, Z_{mnc} , l'impédance équivalente de la partie non contactée au substrat de la membrane :

$$Z_{\text{mnc}} = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{R_{\text{mnc}}^2} + (C_{\text{mnc}}\omega)^2}} \quad (29)$$

Et $Z_{\text{interface}}$ l'impédance équivalente de l'interface neurones/ cristaux liquides :

$Z_{\text{interface}} = R_{\text{ca}}$ pour le conducteur anisotrope

$Z_{\text{interface}} = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{R_d^2} + (C_d\omega)^2}}$ pour le diélectrique.

ω est la fréquence angulaire donnée par $\omega = 2\pi F$.

La couche de cristaux liquides est ici vue comme un composant diélectrique passif. Son comportement électro-optique actif traduisant une variation de potentiel en variation de transmission optique est décrite dans le modèle par la courbe électro-optique théorique du cristal liquide E7 en configuration nématique torsadée, décrite précédemment (cf. section II.B.2), soit $\Delta T = a \times \Delta V$, $a=1,38$ dans le cas de E7 pour la partie linéaire de la courbe.

Cette démarche suivie pour les deux types possibles d'interfaces permet d'aboutir aux résultats présentés Figure 31 et Figure 32 que nous résumons ci-après.

Interface anisotrope

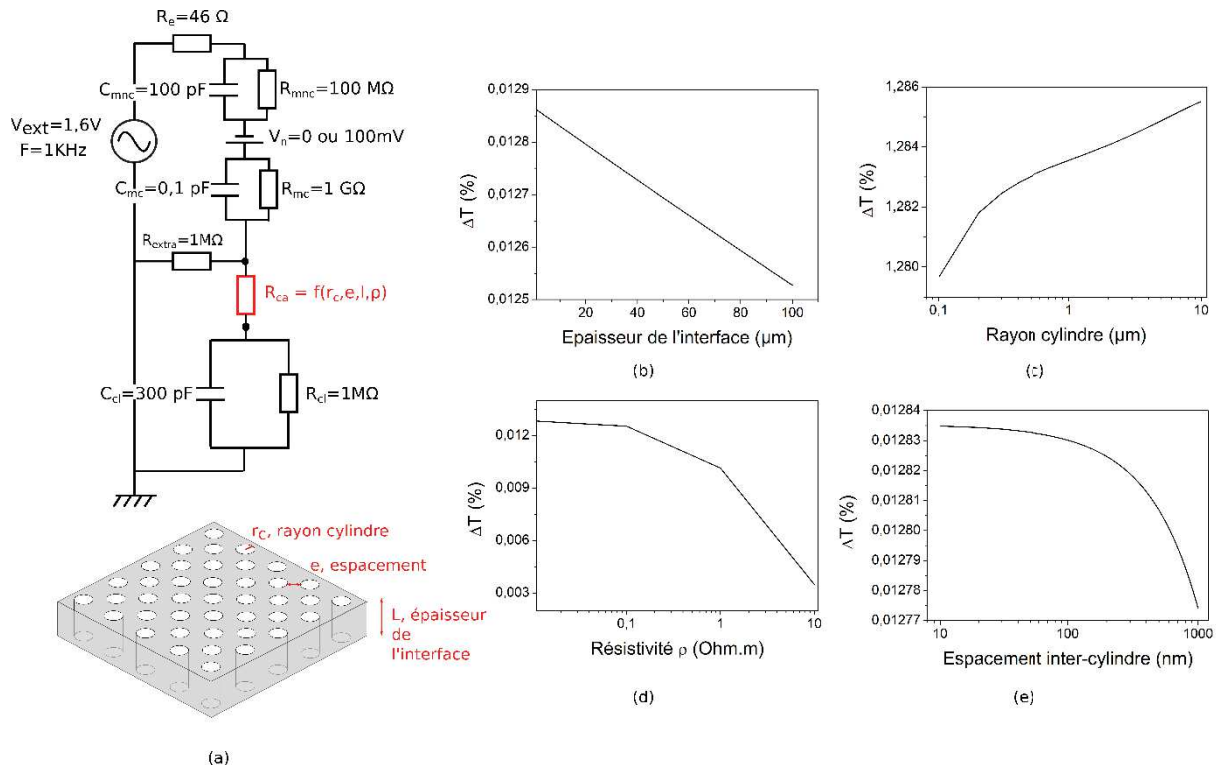


Figure 31 Simulations illustrant l'influence des paramètres de l'interface conductrice anisotrope sur le contraste optique en sortie du transducteur entre un neurone au repos et un neurone traversé par un signal de type potentiel d'action. (a) Circuit électrique équivalent passif. Les valeurs par défaut utilisées pour la simulation sont associées à chaque composant. (b) Schéma de l'interface explicitant les paramètres géométriques et physiques testés : (c) la longueur des cylindres conducteurs, correspondant à l'épaisseur de l'interface, (d) le rayon des cylindres, (e) la résistivité du matériau conducteur et (f) l'espacement inter-cylindre.

On regarde la variation d'intensité en sortie du transducteur entre un neurone actif et un neurone au repos en faisant varier les paramètres de l'interface conductrice anisotrope. Les valeurs par défaut de tous les autres composants Figure 31 (a)) sont tirées de la littérature et décrivent par approximation les propriétés physiques passives de chaque élément du transducteur. Pour le circuit électrique équivalent du neurone, les valeurs trouvées sont globalement cohérentes d'un travail à l'autre. Nous nous sommes basés sur un article passant en revue plusieurs de ces travaux [70].

Les valeurs attribuées à la partie équivalente modélisant les cristaux liquides sont issues des travaux de Costa *et al* [125] pour le cristal liquide E7 avec un alignement homogène, une épaisseur de cellule de 12µm et pour la plage de fréquence moyenne centrée sur 1KHz.

En ce qui concerne la résistance R_{extra} modélisant l'interstice entre le neurone et l'interface du transducteur, des études ont montré que l'épaisseur typique de cet espace interstitiel était de l'ordre de 40 à 100nm, ce qui correspond à une valeur de R_{extra} comprise entre 1 et 2 MΩ [73][128]. Il a été montré qu'augmenter la valeur de cette résistance améliorerait le couplage entre le neurone et son substrat de détection [129], augmentant ainsi la valeur du signal détecté, c'est pourquoi plusieurs travaux reportent des efforts pour améliorer R_{extra} , en changeant la forme des électrodes par exemple. Certains travaux mentionnent avoir atteint des valeurs $>10^8\Omega$ [130].

Les paramètres géométriques et physiques de l'interface (Figure 31 (a)), à savoir le rayon des cylindres conducteurs, l'espacement entre chacun, leur longueur (qui correspond à l'épaisseur de la couche interface) et enfin la résistivité du matériau conducteur utilisé ont été testés individuellement. Les valeurs par défaut sont les suivantes : longueur des cylindres (épaisseur de l'interface) $L=10\mu\text{m}$, rayon $r_c=500\text{nm}$, espacement entre deux cylindres $e=100\text{nm}$ et résistivité $\rho=10^{-2}\Omega.\text{cm}$, qui correspond à la résistivité du silicium dopé n avec une concentration de 10^{17} impuretés/ cm^3 [131], que nous avons utilisé par la suite dans la réalisation de cette interface. Les plages de variations de ces valeurs ont été choisies arbitrairement mais de manière cohérente et plausible avec le dimensionnement futur de cette interface. Par exemple le rayon des cylindres varie de 100nm à $10\mu\text{m}$, 100nm étant la limite basse en deçà de laquelle la conductivité électrique n'est plus décrite par le régime classique. $10\mu\text{m}$ est la limite supérieure de taille tolérable, car c'est la taille caractéristique d'un neurone. Au-delà, l'interface ne sera plus assez résolue pour distinguer chaque neurone individuellement. Il en est de même pour l'espacement entre les cylindres conducteurs, on estime que s'ils sont espacés de plus d' $1\mu\text{m}$, trop d'information de la signalétique neuronale risque d'être perdue.

Les résultats de cette simulation sont présentés Figure 31 (b),(c),(d) et (e). On remarque tout d'abord que les valeurs de variation de transmission sont de l'ordre de celles trouvées dans l'analyse théorique de la partie B.2, soit environ $0,013\%$ pour un signal de type potentiel d'action. Globalement, pour tous les paramètres testés, le contraste optique entre un neurone actif et au repos varie très peu avec les paramètres testés. En effet ΔT varie entre $0,01278\%$ et $0,01288\%$ sur l'ensemble des paramètres géométriques, soit une variation infime de $10^{-4}\%$, a priori non décelable par le capteur optique.

La résistivité intrinsèque du matériau conducteur semble avoir plus d'influence sur le contraste optique en sortie du transducteur puisqu'elle varie entre $0,012\%$ et $0,004\%$. Le contraste optique a tendance à faiblir avec la longueur des cylindres conducteurs et à augmenter avec la taille de leur rayon. Cette variation semble suivre en toute logique la résistance d'un cylindre conducteur donnée par $R=\rho L/\pi r_c^2$ directement influencée par ces 2 paramètres. Une résistance élevée aura tendance à diminuer l'écart de valeurs de V_{cl} vue par la couche de cristaux liquide et donc le contraste optique.

Par ailleurs, plus la distance inter-cylindre augmente et plus le contraste optique diminue. Cette tendance s'explique de manière analogue par une augmentation de la résistance globale de l'interface à cause d'une surface accrue de la matrice de diélectrique entre les cylindres conducteurs. La variation de transmission optique chute lorsque la résistivité du matériau conducteur utilisé augmente.

De manière générale ces résultats montre qu'il est plus avantageux de minimiser la résistance globale de l'interface anisotrope pour optimiser le contraste optique en sortie du transducteur. Il est à noter que ces simulations ne prennent pas en compte l'effet capacitif et résistif de la matrice diélectrique dans laquelle sont contenus les cylindres conducteurs, par conséquent ces résultats sont interprétés de manière qualitative.

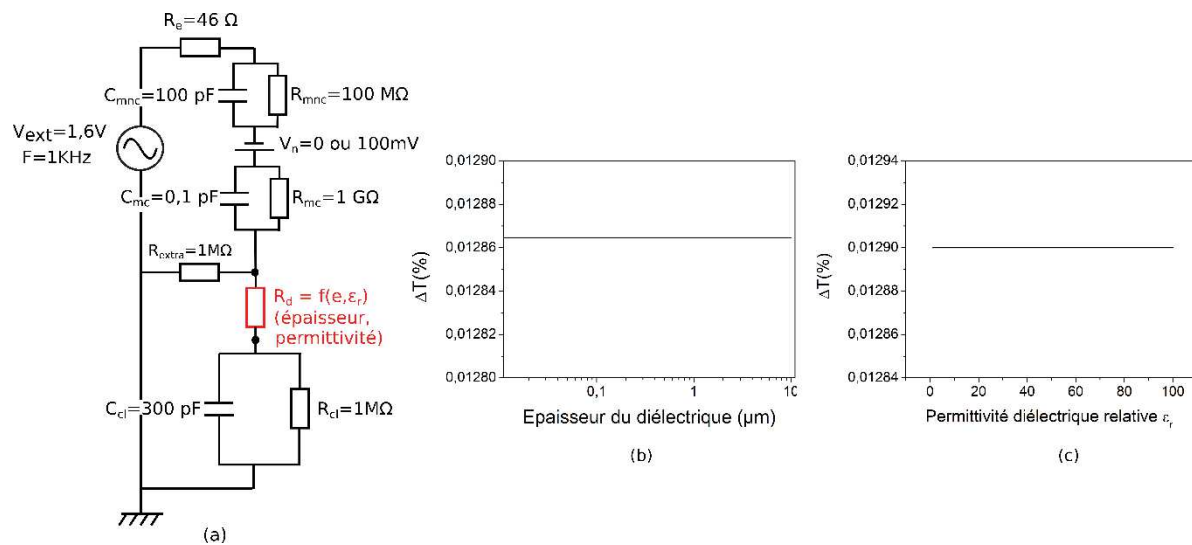
Interface diélectrique homogène :

Figure 32 Influence des propriétés de l'interface diélectrique homogène sur la différence de transmission optique en sortie du transducteur entre un neurone au repos et un neurone présentant un potentiel d'action. (a) schéma électrique équivalent et valeurs par défaut de chaque composant passif. (b) Épaisseur de l'interface. (c) Permittivité diélectrique relative du matériau de l'interface.

En ce qui concerne l'interface diélectrique homogène, nous avons fait varier la différence de transmission optique entre un neurone actif et un neurone au repos en fonction de l'épaisseur et de la permittivité diélectrique relative du matériau utilisé. Les paramètres des autres composants sont tels que décrits pour les simulations de l'interface composite de conducteurs anisotropes encapsulés dans une matrice isolante. Quand ils ne variaient pas, l'épaisseur a été fixée à $1\mu m$, et la permittivité à 7 (permittivité relative du nitrure de silicium). Là aussi, la variation de transmission a été trouvée sensiblement du même ordre que celle trouvée dans l'étude théorique menée précédemment, soit environ 0,013%. Le contraste optique entre un neurone actif et un neurone au repos en sortie du transducteur reste constant quelles que soient les valeurs de l'épaisseur ou de la permittivité diélectrique du matériau. Ce résultat montre surtout que le potentiel vu par la couche de cristaux liquides lorsqu'un neurone présente une activité de type potentiel d'action ne sera pas plus atténué que lorsque ce neurone est au repos. Si l'épaisseur du diélectrique augmente, le potentiel vu par la couche de cristaux liquide V_{cl} va diminuer, l'interface diélectrique atténuant l'intensité du champ électrique. V_{cl} ON (neurone actif) sera atténué autant que V_{cl} OFF (neurone au repos), ce qui explique que la différence d'intensité optique transmise reste constante. Il suffirait alors théoriquement dans ce cas d'augmenter l'amplitude du champ électrique extérieur V_{ext} pour s'assurer que V_{cl} est bien situé entre V_{10} et V_{90} dans la pente de sensibilité du cristal liquide.

Globalement, les résultats de ces simulations peuvent être utilisés de manière qualitative pour avoir une idée de la tendance de l'influence de l'interface utilisée et d'en tenir compte par la suite pour la réalisation du dispositif réel, comme nous le verrons dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

Conclusion de la partie II

Cette partie présentait le dispositif imaginé pour la détection de signaux neuronaux. Chaque élément le constituant a été détaillé : les neurones émettant les signaux à détecter, le transducteur basé sur les propriétés des cristaux liquides présentées dans la partie I, chargé de convertir les signaux électriques issus de l'activité neuronale en variation d'intensité optique et enfin le capteur

enregistrant ces variations optiques en sortie. Une étude théorique détaillée a montré que les propriétés et performances du transducteur inspiré d'une cellule à cristaux liquide en configuration nématique torsadée combinées aux propriétés optiques du capteur étaient adaptées pour la détection de signaux neuronaux. Nous avons en effet calculé une sensibilité minimale du dispositif de $66\mu\text{V}$ et un temps de réponse minimale de 100ns , des performances adaptées aux caractéristiques des deux types de signaux neuronaux détectables extra-cellulairement ; les potentiels d'action PA ($V_{\text{extra}}=100\mu\text{V}$, $t=1\text{ms}$) et les potentiels de champs locaux ($V_{\text{extra}}=1\text{mV}$, $t=10\text{ms}$). L'application d'un champ électrique alternatif qui n'endommage pas les cellules dans leur milieu de culture a été proposée, afin de décaler le potentiel vu par la couche de cristaux liquides dans leur gamme optimale de sensibilité.

Un modèle basé sur un circuit électrique équivalent a été réalisé afin d'explicitier le comportement de chaque élément du dispositif ainsi que leurs interactions mutuelles. Des simulations ont été menées en utilisant ce modèle pour étudier l'influence des paramètres physiques de l'interface neurone/ cristaux liquides, l'élément central du dispositif que nous allons chercher à fabriquer par la suite.

Nous avons montré que le dispositif proposé était adapté à la détection de signaux neuronaux, et nous allons nous évertuer par la suite à réaliser expérimentalement ce dispositif pour obtenir la preuve du concept avancé. La partie suivante de ce chapitre détaille les étapes de fabrication liées à l'élaboration de la cellule à cristaux liquides, le chapitre suivant sera consacré à la fabrication de l'interface neurones/cristaux liquides.

III. Fabrication de la cellule à cristaux liquides

Avec pour objectif final la réalisation d'un dispositif complet permettant la visualisation de l'activité neuronale, cette partie s'attache à définir et à mettre au point les étapes de fabrication d'un des éléments du dispositif final ; le transducteur à base de cristaux liquides. Nous nous sommes d'abord penchés sur la fabrication d'une cellule à cristaux liquides « basique », c'est-à-dire une cellule constituée de deux plaques de verres recouvertes d'ITO renfermant la couche mince de cristaux liquides, afin de prédéfinir les étapes de réalisation principales comme l'alignement des cristaux liquides, la dispense des espaceurs ou encore l'assemblage et le scellement de la cellule. L'interface neurone/CL sera ensuite intégrée à cette cellule basique en remplaçant le substrat supérieur de verre ITO lors de l'assemblage pour former le transducteur final. Ces étapes seront abordées dans les chapitres 3 et 4.

Parmi les choix technologiques relatifs à la fabrication de la cellule à cristaux liquides basique qu'il faut définir pour obtenir l'effet électro-optique désiré, on peut citer :

- Le mode de fonctionnement (la configuration des cristaux liquides)
- Le cristal liquide
- La technique d'alignement des cristaux liquides
- Les matériaux des substrats et des électrodes
- L'épaisseur de la cellule et comment la maintenir constante
- L'assemblage et le scellement hermétique de tous ces éléments.

Nous avons vu précédemment qu'il existait plusieurs façons de structurer la couche de cristal liquide pour obtenir l'effet d'interrupteur optique électriquement contrôlé visé. Notre choix s'est porté sur la configuration nématique torsadée qui s'avère avantageuse pour notre application par rapport à

d'autres modes de fonctionnement pour les raisons que nous avons déjà évoquées (cf. II.A.2). Les cristaux liquides PCH5 et E7 ont été choisis en conséquence pour leurs propriétés adaptées à cette technique. Ils présentent en effet une anisotropie diélectrique positive, une biréfringence optique relativement élevée et ils sont nématiques à température ambiante et à 37°C, ce qui est nécessaire pour la suite des applications biologiques. Les performances de ces cristaux liquides en configuration nématique torsadée ont été par ailleurs validées par l'étude théorique menée dans la partie précédente.

Les autres aspects de la fabrication de la cellule à cristaux liquides sont détaillés ci-après.

A. L'alignement des cristaux liquides

Tous les modes de fonctionnement des cristaux liquides nématiques sont basés sur un changement d'orientation des molécules selon deux états distincts, correspondants à la présence ou non d'un champ électrique. En l'absence de champ électrique, une tierce force opère pour imposer aux cristaux liquides une structure uniforme et bien définie. Cette force est exercée par une fine couche d'alignement dispensée sur les substrats, qui, correctement choisie présente des propriétés permettant l'ancrage et l'alignement des molécules de cristaux liquide en contact avec cette surface. En l'absence de champ électrique les molécules de cristaux liquides reviennent toujours dans la position d'équilibre imposée par ces couches d'alignement.

Dans le cas de la configuration nématique torsadée, la texture à imposer aux cristaux liquides est une structure en hélice formant un angle de 90°. Les molécules sont alignées parallèlement à la surface du substrat, et restent parallèles à ce plan sur toute l'épaisseur de la cellule, la rotation de la structure en hélice s'effectuant dans ce même plan, orthogonalement à la direction d'observation. Dans ce cas, l'ancrage des molécules en contact avec la surface d'alignement est dit homogène ou planaire, en opposition à un alignement homéotrope pour lequel les molécules sont perpendiculaires à la surface. (Ce type d'alignement est rencontré dans d'autres modes de fonctionnement comme le « vertical alignment »). Il existe plusieurs façons d'aligner les molécules de cristaux liquides parallèlement à la surface du substrat. Elles se distinguent par la nature du matériau utilisé, et la façon dont celui-ci est déposé et traité. Nous allons rapidement les passer en revue et justifier nos choix par rapport à cet état de l'art non exhaustif.

1. Le brossage

La méthode classiquement et traditionnellement employée consiste à déposer une fine couche de polymère sur les substrats. Après polymérisation, cette couche est brossée mécaniquement avec un cylindre recouvert d'un linge de velours ou de coton. Cette technique qui peut paraître rudimentaire et peu reproductible à premier abord a pourtant été longtemps la seule permettant l'alignement planaire des cristaux liquides. Elle reste la technique la plus employée aujourd'hui, même dans la fabrication à l'échelle industrielle des dispositifs électro-optiques en tous genres.

Le mécanisme physique régissant l'alignement des molécules en contact avec la surface brossée reste très discuté dans la communauté scientifique à ce jour [105]. Une première hypothèse explique que le brossage mécanique unidirectionnel de la couche d'alignement aurait pour effet d'orienter les chaînes du polymère dans une direction unique entraînant par un mécanisme d'attraction moléculaire de type Van der Waals l'alignement des molécules de cristaux liquides en contact suivant cette même direction [104][132][133][134]. En ce qui concerne la seconde hypothèse proposée par Berreman, c'est le brossage mécanique du polymère par le tissu qui creuserait des micro-rainures à la surface de la couche de polymère, provoquant l'alignement et l'ancrage des cristaux liquides dans ces sillons par minimisation de l'énergie de surface [135][136]. La Figure 33 illustre les deux mécanismes contribuant à l'explication du phénomène d'ancrage des cristaux liquides à la surface d'une couche d'alignement.

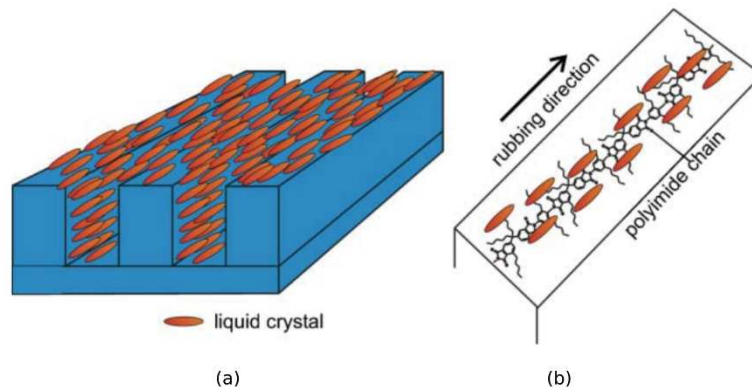


Figure 33 Mécanisme d'alignement des molécules de cristaux liquides d'après (a) la théorie des « grooves » (ou lignes) de Berreman, (b) le modèle d'interaction moléculaire par orientation des chaînes de polymères. D'après [137].

Quoiqu'il en soit, cette technique peut être mise en œuvre de façon assez directe en frottant littéralement le polymère déposé sur le substrat avec un linge. Cependant, pour une utilisation à minima contrôlée et reproductible, il est nécessaire d'utiliser une machine de frottement dédiée, permettant le contrôle fin de la pression exercée, de la vitesse de déplacement du cylindre sur la surface ou encore de son diamètre qui sont autant de paramètres importants influençant l'alignement des cristaux liquides. Ne disposant pas d'une telle machine qui s'est avéré être un investissement trop coûteux, nous avons exclu cette technique du brossage pour l'alignement des cristaux liquides. De plus, bien qu'elle soit couramment utilisée dans diverses applications électro-optiques, cette technique présente plusieurs inconvénients liés au brossage physique comme d'éventuels dépôts de poussières, de rayures du substrat ou encore et surtout la création de charges électrostatiques pouvant nuire au fonctionnement de la cellule.

2. Techniques alternatives

D'autres techniques se sont depuis développées pour palier à ces inconvénients et répondre aux besoins du marché des afficheurs, en explosion ces dernières années. Il a fallu en effet fournir des alignements uniformes et avec le moins de défauts possibles sur des surfaces toujours plus grandes, de manière très contrôlée et reproductible, et qui soient compatibles avec les procédés de fabrication salle blanche de l'industrie des écrans. Toutes ces techniques reposent sur l'un des deux processus d'alignement connus. Parmi ceux qui utilisent le phénomène d'interaction moléculaire entre les cristaux liquides et le matériau polymère déposé, on peut citer le photo-alignement qui consiste à polymériser une résine photosensible via une source d'énergie lumineuse. La réaction photochimique crée un changement structurel local du polymère qui induit l'alignement des cristaux liquides [138]. Il existe plusieurs variantes de cette technique, selon le matériau utilisé ou la réaction photochimique mise en jeu [139].

D'autres techniques alternatives au brossage cherchent à reproduire une structure en forme de micro canaux pour l'alignement des cristaux liquides. Parmi les plus répandues, on peut citer par exemple la gravure ionique réactive (*Reactive Ion Etching*) directement sur le substrat de verre à travers un masque en chrome [140], les techniques de photolithographie classiques [141] et enfin les méthodes de répliquion par contact, comme la lithographie par nano impression [142]. Cette dernière présente de nombreux avantages car elle permet un contrôle précis de la période et de la profondeur des motifs à imprimer, sur une grande surface. De plus il a été montré que la taille et la périodicité des canaux avait une influence sur l'alignement des cristaux liquides [106]. En effet pour une période inférieure au μm , il a été montré que l'ancrage des molécules à la surface était plus fort et fournissait un meilleur alignement [138], et cette dimension submicronique est difficile à atteindre avec une technique de

photolithographie classique. Ces avantages de la lithographie par nano impression combinés au fait que nous avons l'accès et l'expertise de cette technique de micro fabrication au sein de nos plateformes technologiques nous ont poussés à nous orienter vers cette approche pour l'alignement des cristaux liquides.

3. Lithographie par nano impression (NIL)

Dans le cas où des motifs de types canaux sont structurés par cette technique de nanoimpression, c'est le mécanisme prédit par la théorie de Berreman qui régit l'alignement des molécules de cristaux liquides. La nature du matériau utilisé, la périodicité des motifs imprimés ainsi que leur hauteur sont les principaux paramètres influençant l'ancrage des cristaux liquide en contact avec cette couche. Dans la plupart des travaux rencontrés dans la littérature, c'est du PMMA (poly methyl methacrylate) qui est utilisé comme polymère d'alignement. D'après la théorie de Berreman, l'énergie avec laquelle les cristaux liquide s'ancrent à la surface de la couche structurée est donnée par :

$$W = \frac{1}{2} \sqrt{K_{11}} \sqrt{K_{33}} A^2 q^3 \quad (30)$$

Avec A la profondeur des canaux et $q = \frac{2\pi}{p}$, p étant la période des motifs.

Plus cette énergie sera importante, plus les molécules de cristaux liquides seront ancrées à la surface de la couche et meilleur sera l'alignement. D'après cette équation, une période des motifs faible et une forte profondeur des canaux favorisent l'énergie d'ancrage des cristaux liquides. Les travaux rencontrés dans la littérature reportent des périodes (pitch) de motif variant de 50nm à 6µm, pour des profondeurs de 30 à 400nm. En raison des limites technologiques liées au facteur de forme des motifs, plus les canaux sont étroits, moins ils sont profonds. Certains travaux utilisant des motifs avec une période importante de 6µm reportent des énergies d'ancrage similaires à celles obtenues par la technique du broissage soit de l'ordre de 10⁻⁶N/m [143]. D'autres ont tenté d'optimiser cette énergie en réduisant la période des motifs et reportent des valeurs théoriques 3 ordres de grandeur supérieures soit 10⁻³ N/m [144]. Le Tableau 4 reporte quelques paramètres et dimensions de motifs trouvés dans la littérature pour un alignement planaire des cristaux liquides utilisant la technique de lithographie par nanoimpression.

Tableau 4 Dimensions des structures d'alignement de cristaux liquides obtenus par lithographie par nanoimpression reportées dans la littérature.

Dimension des motifs		Matériaux	Cristal liquide	Energie d'ancrage théorique	Réf.
Période	Hauteur				
100nm	100nm	PMMA	E7 (Merck)	4,38.10 ⁻³ N/m	[145]
100nm	50nm	PMMA	ZLI-1132 (Merck)	2,3.10 ⁻³ N/m	[144]
6µm	360nm	NXR 2010 (Nanonex)	8CB	9.10 ⁻⁶ N/m	[143]

En se basant sur la théorie de Berreman et cette succincte revue de la littérature, nous avons choisi parmi les moules à disposition dans notre plateforme technologique un moule dur en silicium présentant des motifs avec une période de 500nm et une profondeur de 170nm. (cf. Figure 35(a)). L'énergie d'ancrage théorique liée à cette structuration est alors donnée par la formule de Berreman par $W_{E7}=3,98.10^{-4}$ N/m pour le cristal liquide E7, ce qui est correct pour un alignement des cristaux

liquides car la valeur se situe dans la plage de valeurs rencontrées dans la littérature, et elle est deux ordres de grandeur supérieure à l'énergie obtenue par la méthode classique du brossage.

Mise au point du procédé d'alignement :

Les étapes de fabrication mises au point pour réaliser cette couche d'alignement sur chacun des deux substrats sont décrites ci-après. A noter que pour cette première phase de développement des techniques de fabrication et d'assemblage de la cellule à cristaux liquides, les deux substrats à assembler sont deux lames de verre recouvertes d'ITO. Le choix de ces matériaux est précisé dans la partie assemblage (III.C) ci-après. Pour le dispositif final, l'un de ces deux substrats sera remplacé par l'interface neurones/cristaux liquides.

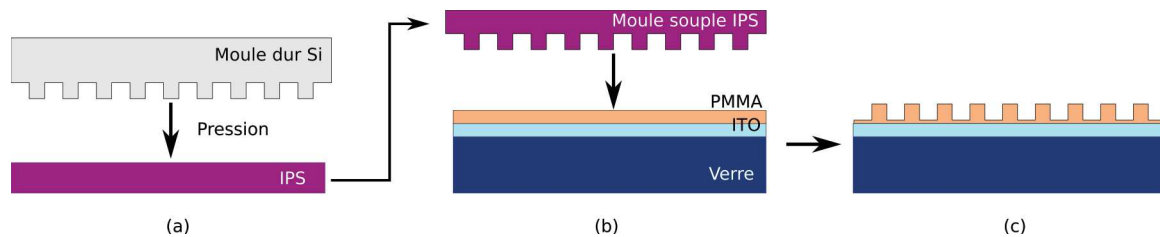


Figure 34 Étapes de fabrication de la couche d'alignement par le procédé de nanoimpression. (a) Les motifs sont d'abord transférés dans un polymère souple (IPS) en pressant le moule dur en silicium structuré par les motifs nanométriques (canaux de 250nm espacés de 250nm profonds de 170nm) et en chauffant au-delà de la température de transition vitreuse de l'IPS. (b) Le moule souple intermédiaire en IPS est à son tour pressé contre le PMMA dispensé sur le substrat, et l'ensemble est porté au-delà de la température de transition vitreuse du PMMA. (c) les deux matériaux sont séparés révélant la structuration finale de la couche de PMMA.

- Nettoyage du substrat : dans un bain d'acétone pendant 15 min aux ultrasons à 35°C suivi par un rinçage à l'isopropanol et un séchage à l'azote. Cette étape est primordiale pour assurer une bonne adhésion de la couche de PMMA.
- Dispense d'un promoteur d'adhérence : VMS652 par spincoating en dynamique à 4000 rpm pendant 60secondes.
- Dispense de PMMA 950K A2 (dilution à 2% dans de l'anisol) par spincoating à 1500 rpm pendant 30 secondes. La couche de PMMA obtenue a une épaisseur d'environ 100nm.
- Recuit à 90°C pendant 1min sur une plaque chauffante pour permettre d'évaporer les résidus de solvant présents dans le film mince de PMMA après spincoating.
- Un moule intermédiaire est d'abord créé en répliquant le moule maître dur en silicium dans un matériau polymère souple IPS (Obducat) par impression NIL à 40 bars et 160°C pendant 120 secondes. La température est ensuite redescendue sous la température de transition vitreuse de l'IPS et les deux matériaux sont séparés. Cette étape intermédiaire permet d'éviter le contact direct entre le moule maître dur et le substrat de verre et protège ainsi le moule maître en silicium d'éventuelles salissures, contaminations voire même de rayures ou de casses.
- Les motifs sont ensuite transférés dans la couche de PMMA par impression du moule en IPS sur le substrat à 20 bars et 110°C pendant 300 secondes. De la même façon qu'à l'étape précédente, la température est redescendue sous la température de transition vitreuse du PMMA ($T_g=105^\circ\text{C}$) et les deux matériaux sont démoulés. Ces valeurs sont les paramètres optimaux permettant un transfert uniforme et conforme des motifs sur l'ensemble du substrat.

Des clichés MEB du moule maître en silicium et des motifs transférés dans la couche de PMMA sont données Figure 35. La dispense d'une couche de PMMA de 100nm d'épaisseur permet d'obtenir les structures en canaux dont les dimensions sont conformes à celle du moule maître (250x250x170nm)

avec une faible épaisseur résiduelle de résine en fond de canaux (environ 20nm). Il a été montré que cette couche résiduelle n'influençait pas l'alignement des cristaux liquides [146].

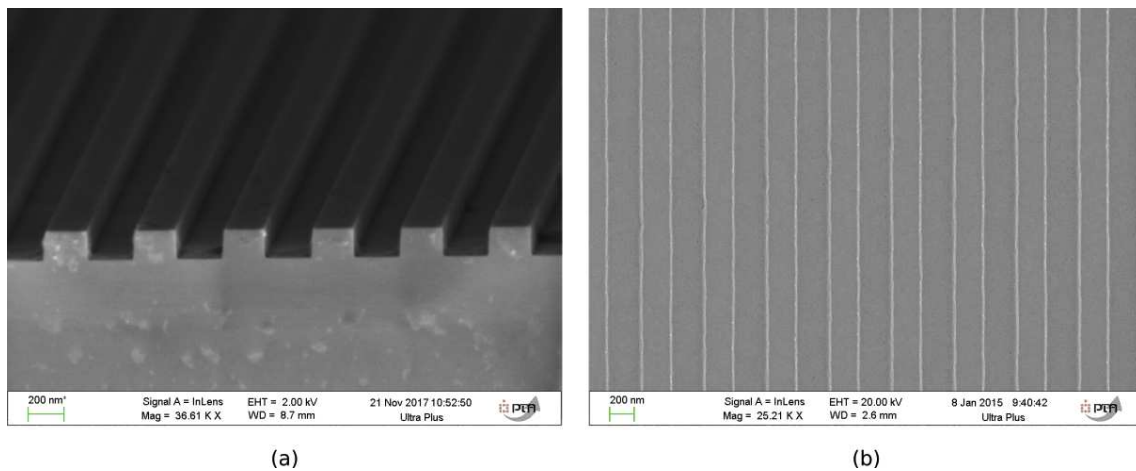


Figure 35 Clichés MEB illustrant la structuration de couche d'alignement. (a) Vue en coupe du moule maître en silicium. (b) Vue de dessus des motifs transférés dans la couche de PMMA.

Nous avons donc développé un protocole expérimental utilisant la lithographie par nanoimpression qui permet de reproduire sur l'ensemble de la surface du substrat (soit 18mmx18mm) des motifs de types canaux de 250nm de large, espacés de 250nm et profonds de 170nm. Ce sont ces structures qui vont permettre par la suite d'aligner les molécules de cristaux liquides en contact et d'assurer leur texture d'équilibre.

B. Espaceurs

Les espaceurs sont nécessaires pour maintenir la cellule à cristaux liquides à la bonne épaisseur et de façon constante et uniforme sur l'ensemble de la surface. Ils ne doivent altérer ni les cristaux liquides, ni la transparence globale du dispositif. Pour respecter ces spécifications, ces cales d'épaisseur sont, dans la majorité des cas, des microbilles dispersées aléatoirement sur le substrat, au cœur de la couche de cristaux liquides. Il est important de ne pas créer de réseaux ou de motifs réguliers ou périodiques susceptibles d'engendrer des figures de diffraction de la lumière incidente et de fausser, de la sorte, les variations de l'intensité optique transmise par la cellule. Pour assurer une épaisseur précise et éviter toute déformation, les microbilles utilisées sont généralement en silice (SiO_2), matériau apprécié pour sa rigidité élevée, limitant d'éventuelles déformations sous pression [147].

Nous avons utilisé des microbilles de silice de chez Corpuscular Inc. de $2\mu\text{m}$ et $4,5\mu\text{m}$ de diamètre. Ces valeurs sont les épaisseurs adaptées pour réaliser les cellules nématiques torsadées avec les cristaux liquides E7 et PCH5 respectivement. Ces microbilles sont dispersées en solution aqueuse et présentent une forte uniformité en taille (1%). Nous les dispensons de manière aléatoire sur le substrat préalablement structuré par la couche d'alignement par spincoating, après les avoir re-suspendues dans de l'éthanol. L'éthanol a été choisi comme solvant car il n'altère pas la couche d'alignement en PMMA et à cause de son fort taux d'évaporation. Un film mince constitué des microbilles aléatoirement dispersées et du solvant est obtenu, et une fois que le solvant s'évapore, les billes adhèrent à la surface du PMMA. Ce processus de dépôt des espaceurs est illustré Figure 36.

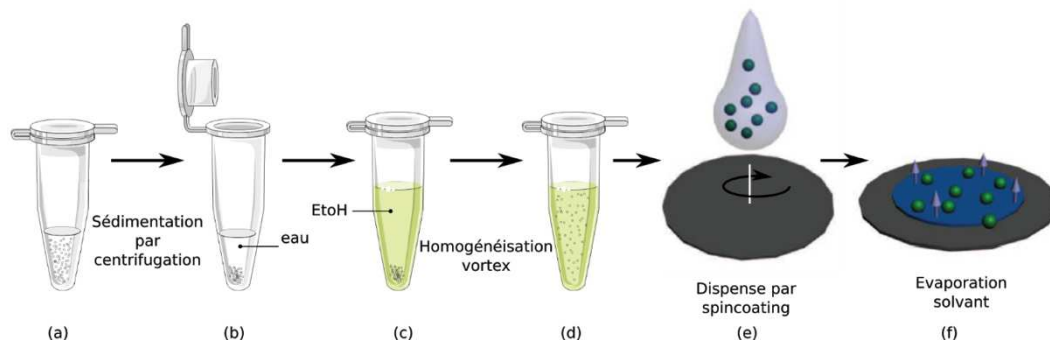


Figure 36 Dispense des espaceurs sur le substrat. (a) Le volume souhaité de la suspension aqueuse de microbilles est prélevé. (b) Les billes sont sédimentées par centrifugation. (c) La phase aqueuse est remplacé par le volume d'éthanol correspondant à la dilution visée. (d) La suspension est homogénéisée à l'aide d'un vortex. Les étapes (b), (c) et (d) sont répétées 3 fois. (e) La suspension est déposée par spincoating sur le substrat. (f) L'éthanol est évaporé.

Protocole expérimental :

- Le volume de billes nécessaire est pipeté dans la solution aqueuse commerciale après l'avoir homogénéisé 60 secondes à l'aide d'un vortex.
- Les billes contenues dans un Eppendorf de 1mL sont centrifugées pendant 75 secondes à 6g pour les séparer de la phase aqueuse par sédimentation.
- La phase aqueuse est pipetée et remplacée par le volume d'éthanol correspondant à la dilution voulue. Ces étapes sont répétées trois fois pour s'assurer que toute l'eau ait été remplacée par l'éthanol.
- La suspension est homogénéisée à l'aide d'un vortex.
- Immédiatement après l'homogénéisation, 100µL de cette suspension sont déposés sur le substrat de verre ITO et spincoaté à 1500rpm pendant 30s.
- Le substrat est placé 30 secondes sur une plaque chauffante à 50°C pour une évaporation complète de l'éthanol.

Distribution surfacique des billes

La densité de billes à disposer sur le substrat n'est pas choisie au hasard. Trop peu de billes ne permettrait pas de maintenir une épaisseur uniforme sur l'ensemble de la surface, le risque étant que le substrat se déforme et que l'épaisseur dévie trop de sa valeur nominale. A l'inverse, une quantité trop importante d'espaceurs nuirait à la transparence du dispositif et perturberait le comportement des cristaux liquides. La densité surfacique est généralement comprise entre 100 et 500 billes/mm² pour des dispositifs industriels [148]. A partir des concentrations initiales des microbilles commerciales, nous avons testé plusieurs dilutions dans de l'éthanol pour obtenir la densité surfacique adaptée. Les dilutions testées sont détaillées dans le Tableau 5.

Tableau 5 Dilutions dans l'éthanol des microbilles initialement concentrées dans de l'eau. La densité surfacique correspondante à chaque dilution est donnée. Les valeurs ont été obtenues par dénombrement des billes dispersées sur le substrat en suivant le protocole expérimental décrit.

Diamètre des microbilles	Concentration en solution	Densité surfacique
2 µm	Initiale : $1,2 \cdot 10^{10}$ billes/mL	
	Diluée x10 EtoH :	14283 µbilles/mm ²
	Diluée x100	2150 µbilles/mm ²
	Diluée x1000	283 µbilles/mm ²
4,5 µm	Initiale : $4,32 \cdot 10^8$ billes/mL	
	Diluée X10 EtoH	457 µbilles/mm ²
	Diluée X100 EtoH	47 µbilles/mm ²

Les dilutions optimales correspondantes aux bonnes densités surfaciques obtenues en suivant le protocole décrit précédemment sont surlignées dans le tableau pour chacune des deux épaisseurs de microbilles utilisées. Un exemple représentatif de la répartition des microbilles à la surface du substrat est donné sur la Figure 37 pour les billes de $2\mu\text{m}$.

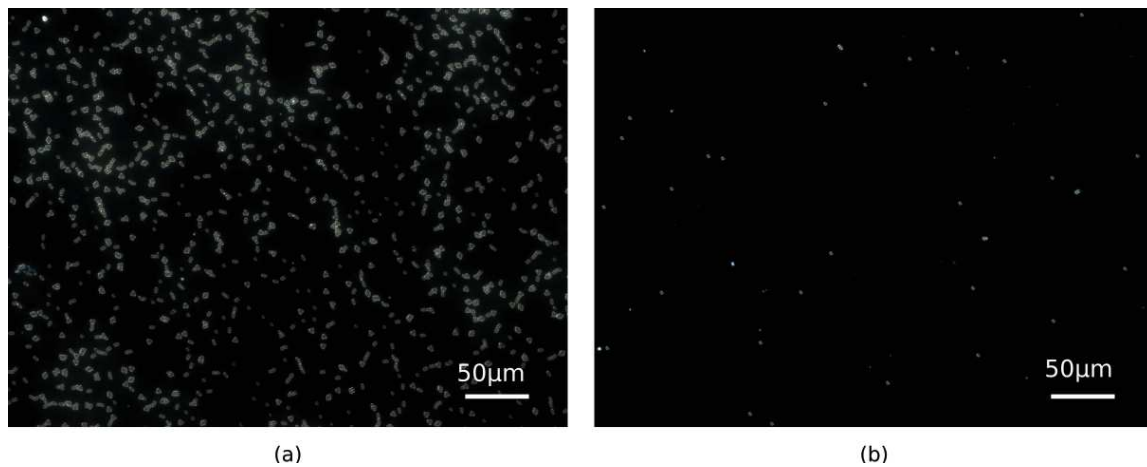


Figure 37 Images de microscopie optique (x20) de la distribution des espaceurs sur la surface du substrat. Cas des microbilles de silice de $2\mu\text{m}$ de diamètre (a) la concentration de la solution dispensée est de $1,2 \cdot 10^9$ billes/mL, ce qui correspond à une dilution x10 de la solution commerciale. La densité surfacique est de 14283 billes/ mm^2 . (b) Concentration de $1,2 \cdot 10^7$ billes/mL (soit 1000x plus diluée que la solution initiale). La densité correspondante est de 283 microbilles/ mm^2 , c'est la densité optimale choisie.

Une fois que les deux substrats de verre ITO ont été structurés par la couche d'alignement, et que l'un des deux a été recouvert de la bonne quantité de microbilles, il faut assembler les deux substrats de façon à former la cellule à cristaux liquide.

C. Assemblage

L'assemblage d'une cellule à cristaux liquide consiste à réunir les substrats préalablement structurés par la couche d'alignement pour confiner à la bonne épaisseur la couche de cristaux liquides. Cette étape peut être réalisée selon deux approches distinctes.

La première est dite collective, et est majoritairement adoptée pour les productions industrielles. Dans ce cas, l'assemblage est opéré à l'échelle d'une plaque de verre entière ou d'un wafer, qui sont ensuite découpés en plusieurs cellules.

La deuxième est individuelle. Au niveau du laboratoire et pour la fabrication de prototypes comme c'est le cas ici, l'approche individuelle à l'échelle de la cellule est à privilégier. Nous avons opté pour cette méthode qui assure plus de liberté car elle est directe et facile à mettre en œuvre. Les substrats sont alors assemblés deux à deux en renfermant la couche de cristaux liquides, puis la cellule est hermétiquement scellée. Les étapes sont schématisées sur la Figure 38 et détaillées ci-après.

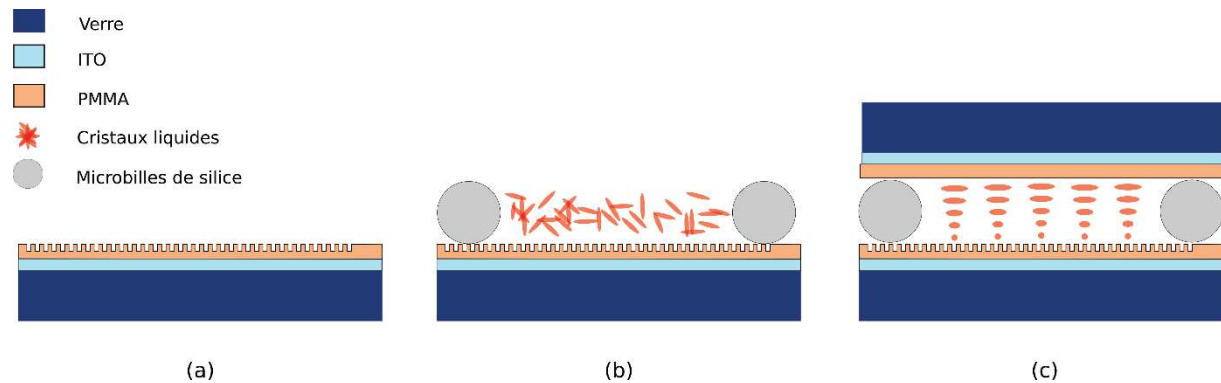


Figure 38 Assemblage de la cellule à cristaux liquides « basique ». (a) Les deux substrats de verre ITO sont recouverts de la couche d'alignement en PMMA. (b) Les microbilles servant de cales d'épaisseur sont dispensées à la surface d'un des deux substrats. Les cristaux liquides sont déposés. (c) Le deuxième substrat est pressé contre le premier. L'ensemble est maintenu pressé pendant qu'un cordon de colle est dispensé tout autour pour sceller la cellule.

Substrats

Les deux substrats à assembler dans cette phase de développement technologique sont deux lames de verres recouvertes de 150nm d'ITO pour former les deux électrodes de la cellule. Le matériau utilisé doit être compatible avec les cristaux liquides, en outre il ne doit pas relarguer d'ions, notamment de potassium pendant sa durée de vie. Nous avons utilisé du borosilicate, un verre plus pur et par conséquent plus cher comparé au soda-lime classiquement rencontré, mais qui permet d'éviter l'éventuel relargage d'ions ou d'impuretés par la suite. Les lames sont des carrés de 18x18mm² et 1,1mm d'épaisseur fournies par *VisionTeK Systems*. Chacune de ces deux lames a été structurée avec la couche d'alignement en PMMA, et l'une d'entre elle a été recouverte de microbilles.

Remplissage

Le remplissage de la cellule par les cristaux liquides peut se faire de deux manières différentes. Soit les deux substrats sont assemblés à l'aide d'un joint de colle de type époxy et les microbilles déposées sur l'un des deux assurent l'épaisseur constante de la cavité. Deux orifices de remplissage sont ménagés dans le joint afin d'introduire le cristal liquide. La cellule est ensuite placée dans une enceinte sous vide et les cristaux liquides imprègnent alors la cavité par capillarité. Les orifices de remplissage sont ensuite fermés. La deuxième solution consiste à déposer le volume de cristal liquide sur le substrat recouvert de billes, puis à presser le deuxième substrat dessus et à sceller l'ensemble avec un joint de colle. Cette technique de remplissage est à privilégier ici par rapport à un remplissage par capillarité sous vide, car elle est plus simple à mettre en œuvre pour des substrats de taille petite à modérée comme c'est le cas dans ce projet.

Une goutte de quelques μL de cristaux liquides suffisant pour remplir la cellule est alors déposée à l'aide d'une micropipette sur le substrat. Le deuxième substrat de verre ITO également structuré de la couche de PMMA est alors déposé de manière à ce que les motifs de PMMA soient en contact avec les cristaux liquides, et que les lignes de ces motifs soient perpendiculaires à celles du premier substrat. C'est cet angle de 90° entre les structures d'alignement qui assure à la cellule à cristal liquide ainsi formée sa texture en hélice.

Scellement

L'ensemble est alors pressé à l'aide d'une pince, l'éventuel excédent de cristaux liquides est évacué. Un cordon de scellement en époxy est déposé tout autour afin de fermer hermétiquement la cellule. La cellule est laissée au repos toute la nuit pour assurer le séchage complet de la colle.

D. Etude de fonctionnement

Au repos

Une inspection par microscopie optique en transmission permet de vérifier la structure au repos de la cellule à cristaux liquide ainsi fabriquée. En plaçant la cellule entre deux polariseurs, l'apparence optique générale est telle qu'observée Figure 39.

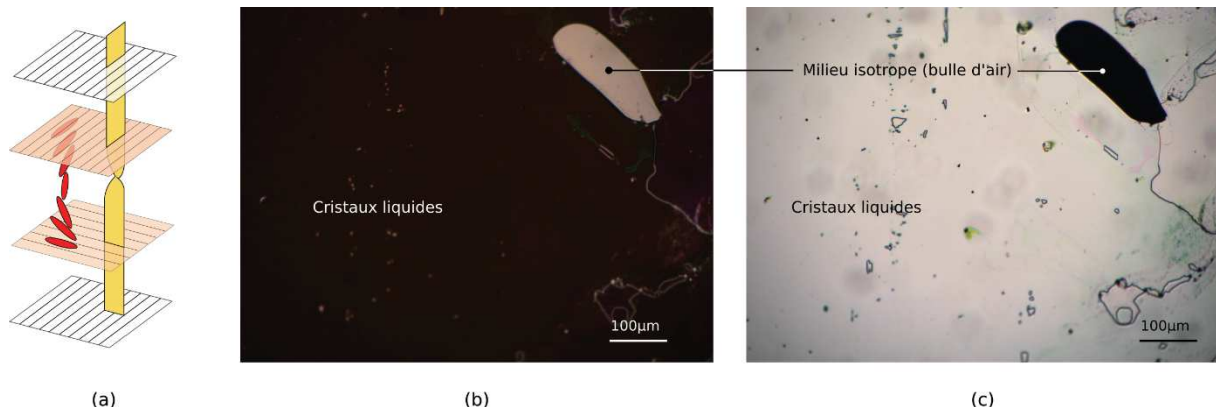


Figure 39 Apparence optique sous microscope en transmission de la cellule à cristaux liquide formée entre deux polariseurs (a) Schéma de principe pour le cas d'une zone à cristaux liquide dans la configuration des polariseurs parallèles (b) Apparence optique en sortie de la cellule pour des polariseurs parallèles. (c) Idem pour des polariseurs croisés.

Lorsque les polariseurs ont leur direction de polarisation parallèles entre elles, alors aucune lumière n'est transmise dans la zone de la cellule remplie de cristaux liquides qui apparaît noire. La zone qui n'a pas été imprégnée de cristaux liquides (bulle d'air) laisse quant à elle passer la lumière et apparaît blanche. L'effet inverse est observé lorsque les directions de polarisation des polariseurs sont placées perpendiculairement. Ces observations permettent de vérifier que les cristaux liquides ont été correctement structurés par les couches d'alignement qui leur impose leur texture en hélice. En effet lorsque la lumière incidente polarisée rectilignement par le premier polariseur passe à travers la cellule, alors l'action de guide d'onde de la structure torsadée opère et tourne la polarisation de la lumière de 90° . La lumière en sortie est alors bloquée par l'analyseur dont la direction de polarisation est alors perpendiculaire à celle de la lumière, et inversement dans le cas de polariseurs croisés. Ces images au microscope permettent par ailleurs de confirmer un alignement homogène des cristaux liquides sur l'ensemble de la surface de la cellule. La zone d'air sans cristaux liquides a été laissée volontairement en guise de repère visuel.

Sous champ électrique : fonctionnement électro-optique

L'application d'un champ électrique alternatif ($F=1\text{KHz}$) aux bornes des deux substrats recouverts d'ITO permet de comprendre le comportement électro-optique de la cellule. La Figure 40 montre la transmission optique à travers la cellule entre deux polariseurs parallèles pour différentes valeurs de tension appliquées.

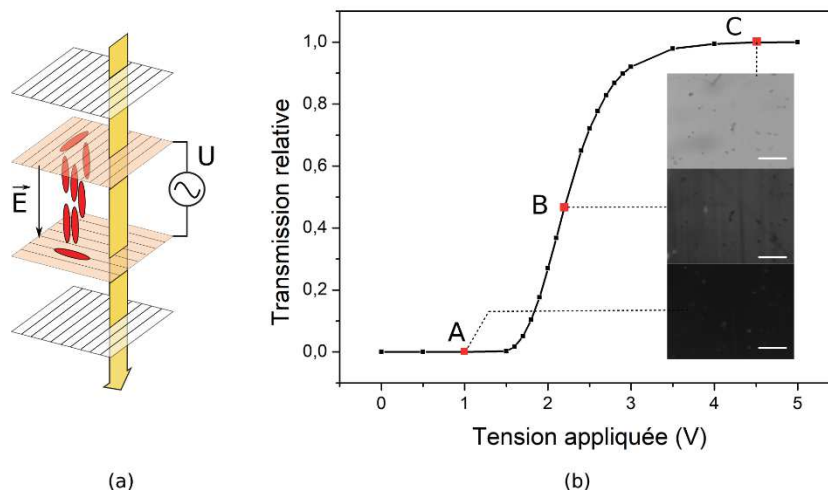


Figure 40 Transmission optique en fonction de la tension appliquée ($F=1\text{KHz}$) pour une cellule nématique torsadée, avec le cristal liquide PCH5, entre deux polariseurs parallèles. (a) Principe de la configuration. (b) courbe électro-optique de la cellule avec en encart les photos de microscopie optique montrant l'apparence optique en transmission à différentes tensions. Barre d'échelle $50\mu\text{m}$.

La courbe Figure 40 révèle le comportement électro-optique d'une cellule à cristal liquide dont l'allure est conforme à ce qui est attendu, avec un seuil autour de 1,5V, une partie linéaire et une tension de saturation autour de 4V. Les photos en encart illustrent l'apparence de la cellule soumise à une tension croissante. Lorsque le champ est nul, les molécules de cristaux liquides restent parallèles aux motifs des couches d'alignement, formant une hélice tordue à 90° . La cellule étant entre des polariseurs parallèles, la lumière n'est pas transmise, la cellule apparaît noire. C'est le « *black off state* » (encart (A)). Quand la tension appliquée augmente et dépasse la valeur seuil (ici 1,5V) alors les molécules commencent à s'aligner avec le champ électrique, laissant passer la lumière. Au fur et à mesure que l'intensité du champ augmente, de plus en plus de molécules s'alignent avec la direction du champ, i.e. perpendiculairement aux surfaces d'alignement, jusqu'à ce que toutes les molécules soient alignées. La lumière transmise atteint alors son maximum et l'image apparaît blanche (encart (C)). C'est le « *bright on state* ». Entre les deux, la transmission optique à travers la cellule est intermédiaire et la cellule apparaît grise. Cela correspond au cas de l'encart (B), pour lequel la tension appliquée a dépassé la valeur seuil, mais n'a pas atteint le palier correspondant au maximum de transmittance. Les molécules ne sont alors que partiellement alignées avec le champ électrique.

La valeur de la tension seuil est légèrement supérieure mais reste proche de la valeur théorique. ($V_{\text{th(PCH5)}} = 1,39\text{V}$). La raideur électro-optique correspondant à la pente de la partie linéaire est trouvée égale à $a=0,69$. La raideur électro-optique « théorique » de PCH5 n'est pas connue. Ces valeurs ne sont pas prédictibles mais peuvent être renseignées par le fournisseur, comme c'était le cas pour le E7, ce qui nous avait permis d'effectuer l'étude théorique. Même si en soit la raideur électro-optique d'une cellule PCH5 est inférieure à celle de E7, (0,69 vs 1,38 respectivement) et n'est a priori pas optimale pour la détection de signaux neuronaux, l'utilisation par défaut du cristal liquide PCH5 a néanmoins permis de valider les étapes de fabrication et d'effectuer les caractérisations préliminaires, avant d'avoir pu nous procurer le cristal liquide E7. Pour ces étapes une performance optimale de la couche de cristaux liquides n'est pas requise. Les performances pourront être optimisées par la suite en remplaçant PCH5 par un cristal liquide adapté (comme E7 par exemple, ou autre) lorsque l'enregistrement des neurones sera envisagé.

Conclusion de la partie III

Ces deux tests ont permis de vérifier le fonctionnement de la cellule à cristaux liquide fabriquée selon les étapes mises au point et décrites dans cette partie. Les résultats confirment un fonctionnement conforme, et montrent que nous avons fabriqué une cellule à cristal liquide nématique avec succès. Nous avons développé et mis au point une technique d'alignement en transférant des motifs de types canaux parallèles par lithographie par nanoimpression dans une couche de PMMA. La structuration de ces couches permet d'aligner correctement les molécules en leur imposant la structure en hélice torsadée à 90° visée, assurant l'effet de guide d'onde optique à la texture du cristal liquide. Nous avons également mis au point les étapes successives de dispense des espaceurs par une technique d'étalement suivie d'une évaporation de solvant, ainsi que l'assemblage et le scellement de la cellule. L'effet d'interrupteur optique électriquement contrôlé a pu être maîtrisé et toutes les étapes de fabrication mises au point et validées. Cette cellule à cristaux liquide simple n'était pas destinée à l'interfaçage neuronal, mais constitue un premier pas vers le développement du dispositif final. La partie active du transducteur convertissant les signaux électriques en variations d'intensité optique est dorénavant technologiquement maîtrisée. Se pose alors la question suivante : comment transmettre les signaux neuronaux à cette couche de cristal liquide structurée ?

Conclusion du Chapitre 2

Dans ce chapitre nous avons introduit les cristaux liquides et leur propriétés particulières, comme leur biréfringence optique, leur anisotropie diélectrique, parmi les plus notables. Nous avons ensuite étudié les principes théoriques fondamentaux des dispositifs exploitant ces propriétés remarquables pour des applications de visualisation. Les cristaux liquides confinés en couche mince entre deux électrodes sont maintenus dans une position d'équilibre grâce aux interactions avec les couches d'alignement recouvrant chacune des deux électrodes qui leur impose dans le cas d'une cellule nématique torsadée une structure en hélice à 90°. L'application d'un champ électrique extérieur permet de modifier cette structure perturbant ainsi la transmission de la lumière incidente à travers la couche de cristaux liquide. Nous avons vu les principales caractéristiques électro-optiques théoriques de telles cellules à cristaux liquides, comme leur gamme de fonctionnement, leur raideur optique ou encore leur temps de réponse dynamiques. Nous avons dans un troisième temps rapidement présenté l'exploitation de ces phénomènes théoriques dans les dispositifs d'affichage industriels pour mieux appréhender leur mise en application.

Dans une deuxième partie nous avons vu comment nous comptons exploiter à notre tour le phénomène d'interrupteur optique électriquement contrôlé engendré par les cristaux liquide pour détecter des signaux neuronaux. Le dispositif imaginé a été présenté et détaillé. Puis une étude théorique poussée a été menée, reprenant toutes les caractéristiques théoriques propres aux cristaux liquides, aux neurones, et au capteur optique envisagé, pour la plupart présentées dans les premiers chapitres. Cette partie a permis de montrer qu'il était possible de détecter des signaux de types neuronaux avec un transducteur à cristaux liquides, convenablement couplé à un capteur optique adéquat. Les caractéristiques de fonctionnement d'une cellule à cristaux liquide telles que sa sensibilité ou sa dynamique de réponse se sont avérées assez performantes pour détecter des signaux issus de l'activité neuronale. Une solution a été proposée pour décaler le signal vu par le transducteur

dans sa gamme de fonctionnement optimale. Une cellule à cristaux liquide présente en effet un seuil de l'ordre du V, supérieur à la valeur caractéristique d'un signal neuronal (de l'ordre du mV voire μV) en deçà duquel aucune variation d'intensité n'est produite en réponse au champ électrique. La solution envisagée consiste à placer les neurones interfacés au transducteur dans un champ électrique global ne les endommageant pas. Un modèle basé sur un circuit électrique équivalent a été réalisé afin d'explicitier le comportement de chaque élément du dispositif et leurs interactions mutuelles. Des simulations ont été menées en utilisant ce modèle pour étudier l'influence quantitative des paramètres physiques de l'interface neurone/ cristaux liquides, un des éléments clé du dispositif.

Enfin dans une dernière partie nous avons fabriqué une cellule à cristaux liquide nématique torsadée « simple » afin de développer et de fixer les techniques de fabrication liées au transducteur à cristaux liquides. Nous avons exploré et arrêté nos choix sur les matériaux et la configuration à utiliser, la technique d'alignement et celle du contrôle de l'épaisseur, l'assemblage et le scellement final de la cellule. La structure en hélice ainsi que l'effet d'interrupteur optique électriquement contrôlé qui en découle ont été validés. Cette cellule à cristaux liquide simple n'était pas destinée à l'interfaçage neuronale, mais constitue un premier pas vers le développement du dispositif final

Dans ce chapitre nous avons donc étudié, fabriqué puis exploité une cellule à cristaux liquide capable de traduire un champ électrique en variation d'intensité optique. La partie active du transducteur convertissant les signaux électriques en variations d'intensité optique est technologiquement maîtrisée. Comment transmettre les signaux neuronaux à la couche de cristal liquide structurée ? Le chapitre suivant décrit les solutions explorées pour répondre à cette problématique clé du dispositif : l'interface neurone/cristaux liquides.

Chapitre 3

Interface Neurones/Cristaux liquides

Nous avons vu précédemment comment réaliser une cellule d'affichage à base de cristaux liquides, capable de convertir un champ électrique en variation d'intensité optique. Nous voulons maintenant interfacier les neurones à une telle cellule afin de convertir leur activité électrique en variation d'intensité optique susceptible d'être affichée par le capteur CMOS. L'idée est d'exploiter le signal électrique émis par un neurone en activité pour réorienter localement les cristaux liquides situés en dessous de ce neurone. Dans ce chapitre nous allons, dans un premier temps, évaluer les spécifications requises pour cette couche d'interfaçage. Dans un deuxième temps, nous verrons les développements technologiques amorcés dans le but de fabriquer cette interface et les différents facteurs et contraintes qui expliquent pourquoi certains de ces développements n'ont pas abouti. Enfin, nous présenterons la solution technologique retenue.

I. Cahier des charges de l'interface neurones/cristaux liquides.

En vue d'interfacier les neurones biologiques à la cellule à cristaux liquides développée, une question fondamentale s'est posée :

Comment transmettre les signaux neuronaux à la cellule à cristaux liquides ? C'est la question la plus ardue de ce travail de thèse. Elle impacte fortement la conception et la réalisation de la couche membrane qui sépare les neurones en culture des cristaux liquides. Cette couche doit alors satisfaire les critères suivants :

- Transmettre localement et « verticalement » les signaux électriques des neurones vers la couche sous-jacente de cristaux liquides.
- Être suffisamment transparente optiquement de manière à récolter les variations d'intensité optique sur le capteur imageur sans atténuation majeure.
- Assurer l'alignement des molécules de cristaux liquides : elle doit être suffisamment rigide et plane pour permettre de disposer d'une épaisseur uniforme et homogène de cristaux liquides et de garantir leur alignement.
- Enfin, elle doit être compatible biologiquement avec les neurones et permettre leur viabilité pendant les durées pertinentes pour les observations courantes en neurosciences (typiquement une durée de 14 jours est requise pour atteindre la maturité des neurones utilisés dans notre application).

Pour répondre à cette dernière problématique, deux possibilités s'offrent à nous :

- La première, très intuitive, consiste à s'orienter vers des matériaux électriquement conducteurs mais d'une façon mono-directionnelle (ou anisotrope). Il faut en effet, pour les besoins d'organisation de cristaux liquides, que les signaux électriques soient transmis « verticalement » des neurones à la couche sous-jacente de cristaux liquides en évitant tout phénomène de *cross-talk* latéral entre neurones voisins. Ce confinement vertical est

indispensable car il est directement issu du principe de fonctionnement de notre dispositif où le but recherché est une détection de l'activité des neurones à l'échelle individuelle.

- La deuxième possibilité consiste à élaborer cette couche d'interfaçage dans un film, non conducteur, homogène et uniforme à condition que ce film soit suffisamment mince pour ne pas écranter le champ électrique émis par les neurones et garantir la transmission locale des signaux neuronaux aux cristaux liquides.

Les deux pistes ont été explorées. Pour la première catégorie de solutions envisagées, nous nous sommes orientés vers la réalisation de matériaux composites formés de conducteurs verticaux noyés dans une matrice isolante. Nous présentons dans le paragraphe suivant, les matériaux et techniques testées pour obtenir de telles interfaces conductrices anisotropes tout en restant optiquement transparentes. En ce qui concerne la deuxième famille de solutions envisagées, nous avons choisi une interface mince diélectrique dont les caractéristiques et méthodes de fabrication seront exposées dans la section III de ce chapitre.

II. Interface composite

Une première définition de ces matériaux composites consiste à envisager un ensemble de fils conducteurs verticaux et débouchant encapsulés dans une matrice isolante et transparente.

La première exigence de dimensionnement de ces matériaux composites concerne alors leur morphologie : il faut, en effet, que le réseau de fils conducteurs soit au moins autant, voire mieux, résolu que la matrice de pixels de l'imageur CMOS situé à l'autre extrémité de notre dispositif. Typiquement le diamètre des fils doit être plus petit qu'un neurone pour garder la résolution unicellulaire, et éviter qu'un fil conducteur collecte des signaux électriques provenant de plus qu'un neurone.

Nous nous sommes donc orientés vers la synthèse de réseaux de fils verticaux conducteurs, dont les diamètres sont de l'ordre du μm ou inférieurs au μm , que nous appellerons dans certains cas, par abus de langage, des nanofils. (Par convention, les nanosciences définissent un nanofil comme un objet ayant au moins deux de ces dimensions $<100\text{nm}$).

Vient ensuite la question du matériau conducteur à adopter. Là aussi plusieurs choix s'offrent à nous : i) des métaux ou semi-conducteurs, qui, dispersés dans une matrice isolante transparente n'altèreraient pas l'absorbance de la couche, ou ii) des polymères conducteurs également encapsulés dans une matrice isolante et transparente. Dans tous les cas, et comme illustré sur le schéma de la Figure 41, le choix est une matière de compromis entre les paramètres suivants :

- Propriétés intrinsèques du matériau conducteur des nanofils : conductivité électrique, tenue mécanique et biocompatibilité
- Morphologie du réseau de nanofils : épaisseur, densité et diamètre des nanofils
- Propriétés intrinsèques de la matrice isolante : tenue mécanique, transparence optique et biocompatibilité
- Propriétés finales de la membrane composite : transparence optique, tenue mécanique et biocompatibilité. Si cette dernière n'est pas acquise, l'aptitude de cette interface à être fonctionnalisée sur sa surface en contact avec les neurones devra être explorée.
- Enfin, et il s'agit du critère le plus contraignant dans une démarche comme la nôtre, à savoir l'intégrabilité du procédé adopté au reste du dispositif : selon la stratégie de fabrication

retenue, sera-t-il possible d'intégrer cette interface composite aux autres composants du transducteur électro-optique ?

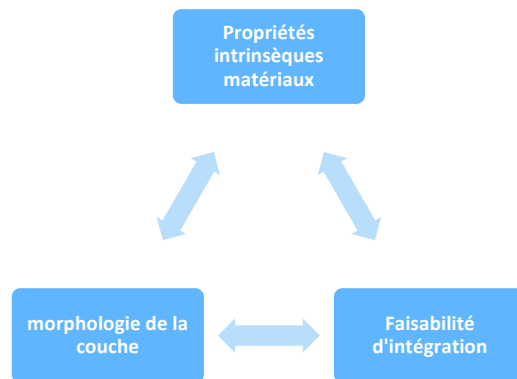


Figure 41 Stratégie adoptée lors de la conception et la réalisation de l'interface séparatrice entre neurones et cellule à cristaux liquides

Nous rappelons ici que, même si notre travail visait essentiellement à obtenir la preuve du concept, nous nous sommes toujours intéressés à évaluer le potentiel des étapes technologiques adoptées dans une approche de type « production » de petites et moyennes séries : leur coût, leurs disponibilités sur les plateformes technologiques de micro et nanofabrication ainsi qu'à leur aptitude à traiter des grandes surface (*scalabilité*) ont toujours été pris en compte.

Dans les paragraphes suivants, nous allons décrire les principales approches de fabrication et d'intégration de la membrane composite qui ont été amorcées et qui paraissent les plus prometteuses. Nous les avons classées en deux catégories selon la nature de l'élément conducteur de cette couche hybride :

- Un polymère conducteur
- Des nanofils (ou piliers) de silicium.

La première sous-partie regroupe les différentes stratégies de structuration du polymère conducteur dans divers matériaux isolants, puis l'intégration des composites dont la synthèse a abouti. La deuxième sous-partie concerne les essais relatifs à la fabrication et l'intégration du matériau hybride composé de nanofils de silicium encapsulés dans diverses matrices isolantes.

A. Polymère conducteur dans une matrice isolante

1. Choix du polymère conducteur : Le PEDOT

Le PEDOT, ou poly(3,4-ethylene dioxythiophène), est un polymère conducteur très utilisé ces dernières années notamment pour ses propriétés remarquables de conductivité électrique et bonne stabilité chimique dans des domaines allant de la recherche fondamentale [149],[150] aux applications en nanoélectronique et électronique moléculaire (diodes et transistors à effet de champ) [151],[152], en nano matériaux composites ou encore dans les nano-biotechnologies et la médecine [153],[154],[155],[156].

Le PEDOT est obtenu suite à des procédés standards d'oxydation ou de polymérisation électrochimique du monomère éthylène -3,4-dioxythiophène (EDOT). Cependant ce polymère étant

insoluble dans la plupart des solvants, il est pour une majorité d'applications utilisé en combinaison avec un poly électrolyte hydrosoluble, le poly(styrène sulfonate) PSS. Le complexe PEDOT-PSS se présente alors commercialement sous forme de dispersion aqueuse bleu à bleu foncée, composée des particules de PEDOT-PSS dispersées dans 90 à 95% d'eau et plus ou moins conductrice selon les dopages, la taille des particules ou encore les solvants utilisés. La conductivité de films de PEDOT-PSS peut en effet être considérablement augmentée avec l'ajout de solvant comme le diméthyle sulfoxyde DMSO ou l'éthylène glycol EG [157]. La Figure 42 donne une représentation schématique d'une particule de PEDOT-PSS sur laquelle les chaînes de polymère du PEDOT sont représentées en bleu, et celles du PSS en rouge, ainsi que la dispersion des différentes tailles de particules dans une solution commerciale.

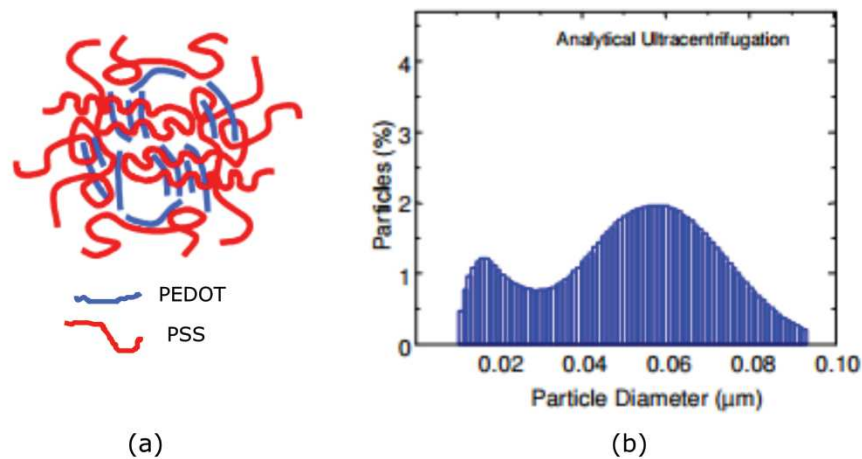


Figure 42 (a) Représentation schématique d'une particule de PEDOT-PSS. (b) Dispersion de particules de PEDOT-PSS dans des solutions commerciales du nom de CLEVIOS™ (Heraeus), adapté de [158].

Ce polymère a une conductivité qui peut varier de quelques fractions à quelques centaines de $S.cm^{-1}$, selon la méthode de synthèse, le dopage ou encore la géométrie étudiée. Une telle gamme de variation est intrinsèquement très intéressante car elle couvre des valeurs de conductivité typiques d'isolants, de semiconducteurs, voire, de métaux (Figure 43-a).

Sous sa forme 1D de nanotube ou nanofil (diamètre $<200nm$) et pour une même méthode de synthèse, il a été montré que le PEDOT a une conductivité électrique à température ambiante qui augmente quand le diamètre du fil diminue (Figure 43-b) [159]. Elle peut atteindre typiquement $550 S.cm^{-1}$ pour des diamètres de $25nm$. Cet effet est généralement attribué à un meilleur agencement moléculaire avec l'alignement des chaînes de polymères dû à la réduction du diamètre des brins de polymères.

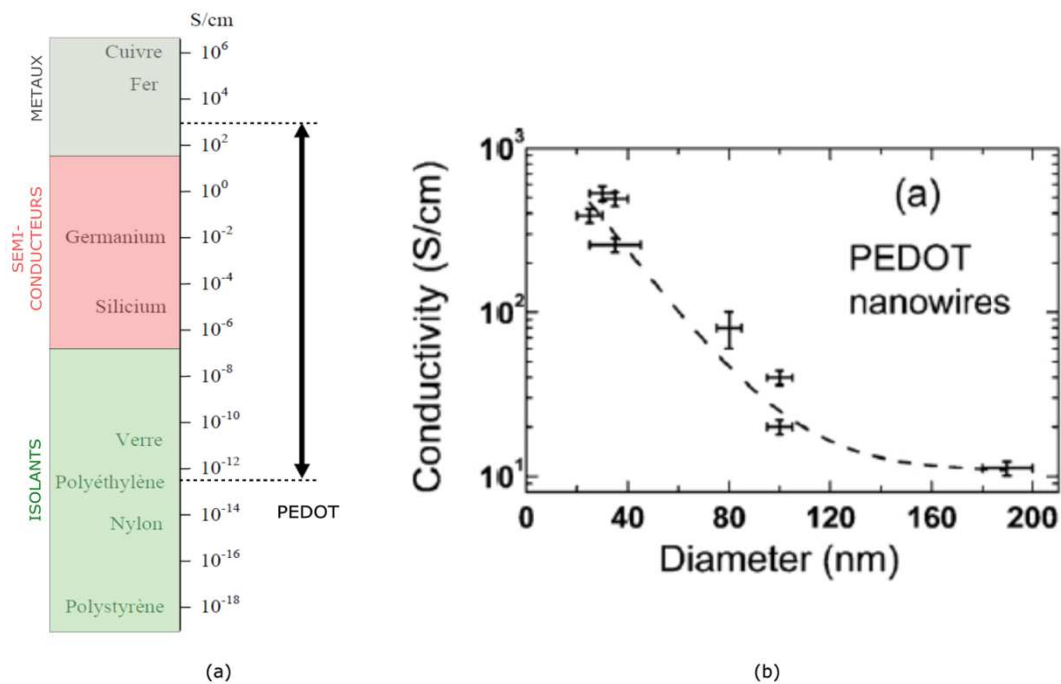


Figure 43 Propriétés de conductivité électrique du PEDOT. (a) Graphique comparatif des domaines de conductivité du PEDOT, adapté de [160]. (b) Variation de la conductivité de nanofils de PEDOT synthétisés par la méthode *hard template* en fonction de leur diamètre. [159]

Il existe plusieurs méthodes de synthèse de nanofils de PEDOT. Les plus répandues, et que nous avons utilisées, sont les méthodes dites *hard template*. Cette approche consiste à partir d'un moule dur (*hard template*), typiquement une membrane poreuse débouchante de part et d'autre dont on peut contrôler la taille et l'arrangement de pores, pour ensuite le remplir d'un matériau en solution qui épouse les formes des pores. On obtient alors un réseau de nanofils du matériau souhaité, alignés verticalement de longueur et diamètre contrôlés.

Pour la synthèse de nanofils isolés, cette méthode présente l'inconvénient de rajouter une étape supplémentaire d'élimination du moule dur pour libérer les fils. A contrario, pour notre application, elle présente à premier abord l'avantage de fournir directement le matériau hybride visé, composé d'un réseau de nanofils conducteurs verticaux et débouchants de part et d'autre, noyé dans sa matrice isolante « naturelle ».

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons cherché dans un premier temps à utiliser l'alumine nanoporeuse comme *hard template* avant de considérer des membranes poreuses en polycarbonate. Nous avons obtenu quelques résultats préliminaires assez probants. Mais devant les difficultés d'intégration de telles membranes composites auto supportées, nous nous sommes orientés vers une approche plus conventionnelle basée sur la structuration de PEDOT par photolitho-gravure en réseau de micro-plots avant de les encapsuler dans un film isolant. Ces trois approches vont être décrites dans les sous-paragraphe suivants.

2. Alumine nanoporeuse comme *hard template*

➤ Synthèse de l'alumine nanoporeuse

Les membranes d'alumine nanoporeuse sont synthétisées par anodisation électrochimique de l'aluminium. Elles ont été fabriquées dans des cellules en PVC selon le montage schématisé Figure 44 (a) en collaboration avec O. Marconot du laboratoire SiNAPS (CEA). Une feuille d'aluminium extra pur de 100 μm d'épaisseur est placée au fond de la cellule et contactée sur sa face arrière par une électrode en acier inoxydable. La zone centrale de l'autre face de l'échantillon est alors exposée à l'électrolyte qui est constitué, dans notre cas de l'acide oxalique ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) à 3% en concentration massique [161]. L'étanchéité est assurée par un joint torique et la température est maintenue constante (à 8°C dans notre cas) grâce à un serpentin faisant circuler de l'éthylène glycol refroidi. Un agitateur magnétique évacue l'hydrogène produit et régénère les espèces chimiques à proximité de l'échantillon. Une alimentation électrique permet d'appliquer une différence de potentiel continue entre l'échantillon et une contre-électrode de platine/iridium.

L'oxyde d'aluminium formé se dissout et entraîne ainsi la croissance de nanopores verticaux suivant les lignes de champ électrique. L'organisation des pores ainsi formés (période et densité) est directement dictée par la tension appliquée [14]. Nos membranes ont été réalisées à 40V ce qui correspond à une période de $93\pm 4\text{nm}$ et une densité de $1,2\times 10^{10}$ pores/ cm^2 comme le montre la Figure 44 (b). Les pores sont ensuite élargis par gravure chimique dans l'acide phosphorique H_3PO_4 , 5%wt à 35°C, en contrôlant le temps de gravure selon la taille désirée. Puis, l'épaisseur d'aluminium non anodisée est gravée dans une solution composée de chlorure de cuivre et d'acide chlorhydrique (CuCl_2/HCl) pour obtenir enfin une membrane d'alumine transparente comme le montre la Figure 44(c).

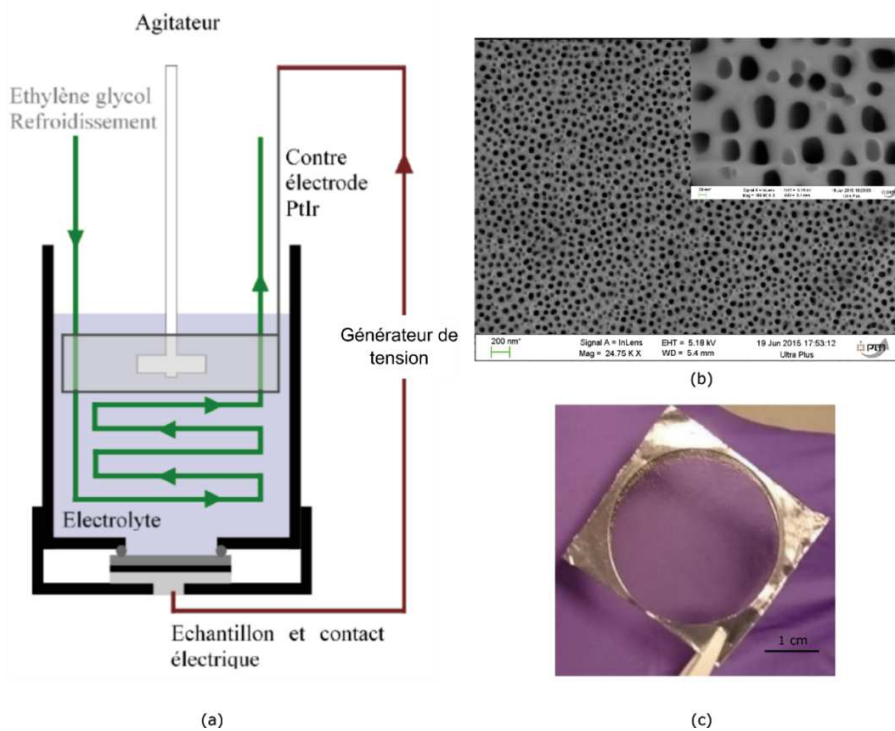


Figure 44 Synthèse des membranes d'alumine nanoporeuse. (a) Cellule électrochimique utilisée pour l'anodisation de l'aluminium [161]. (b) Cliché MEB d'une membrane d'alumine nanoporeuse obtenue avec une tension d'anodisation de 40V dans de l'acide oxalique. Agrandissement en insert, barre d'échelle 20nm. (c) Photographie d'une membrane d'alumine nanoporeuse synthétisée.

Le dimensionnement de la membrane d'alumine, à savoir la taille et l'espacement des pores, ainsi que l'épaisseur de la membrane ont été déterminés selon plusieurs spécifications. Pour le diamètre des pores et leur espacement, nous avons déjà mentionné au début de ce chapitre que la principale spécification pour notre application est d'avoir un réseau de nanofils conducteurs de dimension caractéristique inférieure à la taille d'un neurone soit environ $10\mu\text{m}$, et si possible inférieur aussi à la taille des pixels de l'imageur afin de discrétiser correctement les signaux neuronaux. Par ailleurs, et comme illustré sur la Figure 43-b, la conductivité électrique des nanofils de PEDOT est considérablement augmentée en réduisant leur diamètre [159]. Nous avons par conséquent visé, lors de l'élaboration du *hard template* en alumine, des pores les plus petits possibles permettant, en théorie, d'accéder à la meilleure conductivité électrique possible. Cependant, les solutions PEDOT-PSS avec lesquelles nous travaillons présentent des dispersions de nanoparticules du complexe PEDOT-PSS avec des tailles variant de 20 à 80 nm. Une taille de pores d'environ 100nm a donc été choisie en compromis des deux critères précédents.

Enfin, et en ce qui concerne l'épaisseur de cette membrane d'alumine nanoporeuse et autosupportée, nous avons visé une épaisseur suffisamment grande (supérieure à $30\mu\text{m}$) pour obtenir une bonne tenue mécanique.

➤ **Remplissage de la matrice d'alumine par le polymère.**

Une fois la membrane nanoporeuse rigide créée, il existe deux voix principales pour remplir des pores avec du PEDOT. La première est la méthode électrochimique qui consiste à polymériser les monomères d'EDOT par oxydation dans le même type de cellule électrochimique que celle utilisée pour la formation de l'alumine nanoporeuse. Cependant nous avons écarté cette méthode de remplissage car elle nécessite le dépôt d'une couche de métal, souvent de l'or comme électrode de travail sur la membrane nanoporeuse. Cette couche métallique s'avère être trop contraignante dans notre cas car elle impliquerait une étape supplémentaire de dépôt puis de retrait. Nous nous sommes donc orientés vers une méthode plus directe de remplissage des pores, la méthode d'imprégnation dite *wetting template*. Cette dernière consiste à faire pénétrer le polymère en solution dans les pores par capillarité. Nous avons utilisé des dispersions de PEDOT-PSS de 1,3 et 1,1% wt dans de l'eau de chez Sigma Aldrich et nous avons essayé de faire pénétrer le PEDOT soit en immergeant les membranes d'alumine directement dans un bécher rempli de la solution de PEDOT-PSS, soit en déposant un petit volume de la solution (quelques μL) sur la surface de l'alumine, en plaçant les échantillons dans un dessiccateur pour faire le vide et favoriser l'imprégnation des pores.

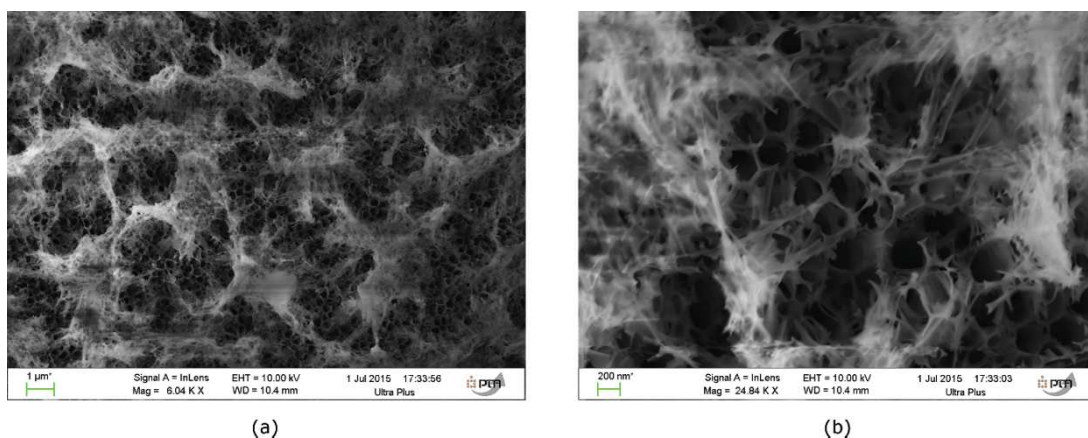


Figure 45 Clichés MEB de membrane d'alumine nanoporeuse obtenue par anodisation à 40V et gravure de 8min dans l'acide phosphorique, après imprégnation de PEDOT-PSS par *template wetting*.

Les résultats ainsi obtenus sont illustrés sur les clichés MEB de la Figure 45. L'observation de ces images montre bien un certain contraste entre pores et matrice d'alumine. Par contre il est difficile de dire à première vue si le PEDOT a rempli correctement les pores de l'alumine. Il aurait fallu faire une analyse chimique plus poussée en utilisant par exemple les électrons rétrodiffusés du MEB qui donnent un contraste selon le numéro atomique des éléments pour identifier correctement la présence ou non du polymère dans les pores. Cependant nous observons avant même le remplissage complet des pores la formation d'un film quasi-continu en surface de l'alumine, ce qui ne correspond pas aux spécifications requises, car il ne faut pas que les fils de PEDOT soient interconnectés (Figure 45). Ce film pourrait être retiré par une étape supplémentaire de gravure, ou de polissage de la membrane. Or, une telle étape n'est pas envisageable compte tenu de la relative fragilité de la membrane. Cette dernière s'est avérée en effet difficilement manipulable car très friable marquant de nombreuses « casses » pendant nos premières tentatives de manipulations (par exemple pour l'étalement par spincoating de la résine PMMA destinée à être structurée, ultérieurement, par nanoimpression). Nous nous sommes donc orientés vers l'utilisation d'un *hard template* d'un autre matériau plus « flexible » que l'alumine comme matrice isolante pour les nanofils de PEDOT.

3. Polycarbonate nanoporeuse comme *hard template*

L'autre matériau très utilisé dans la méthode *hard template* pour la fabrication de nanofils comme cité précédemment sont les membranes de polycarbonate nanoporeuses. La porosification du polycarbonate est obtenue grâce à l'irradiation de sa surface par un faisceau d'ions énergétiques suivie d'une attaque chimique sélective. Le produit ainsi obtenu est appelé *track etched* et est disponible sur le marché avec un vaste choix de taille et densité de pores et différentes épaisseurs (Whatman®, cyclopore®, etc.). Cependant, et contrairement à l'alumine qui présente un réseau de nanopores organisé quasi hexagonal, les membranes de polycarbonates présentent généralement une structure poreuse non organisée du fait du bombardement aléatoire des ions lors du processus de *track etching*. Nous avons, pour notre part, travaillé avec les membranes *track etched* dont la taille de pores est de l'ordre de 400nm, de chez Sigma Aldrich dont une vue de dessus obtenue par microscope électronique à balayage est donnée en Figure 46 (a). Leur principal avantage par rapport à celle d'alumine nanoporeuse réside effectivement dans leur caractère flexible comme il est permis de voir sur la Figure 46 (b) qui représente une vue par microscope électronique de la tranche des membranes étudiées.

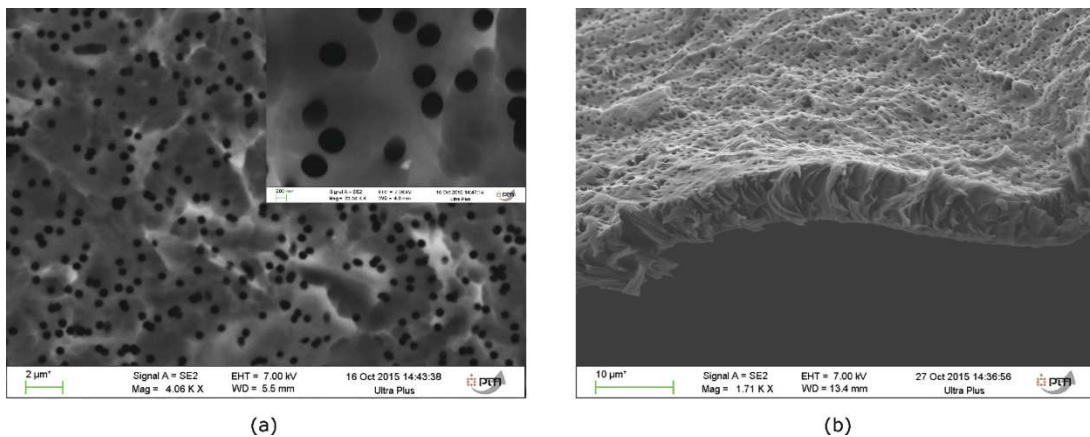


Figure 46 Clichés MEB de membranes de polycarbonates nanoporeuse. (a) Vue de dessus et agrandissement en insert. (b) Vue de la tranche.

En revanche la propriété rédhibitoire de ces membranes est que leur nature chimique (Polycarbonate) n'est pas compatible avec l'étape technologique ultérieure (étalement et puis structuration d'un film mince de PMMA avec les microcanaux d'alignement de cristaux liquides). En effet, le solvant de choix

de cette dernière, l'anisol, dissout également le polycarbonate, rendant impossible l'intégration de telles membranes dans le dispositif global. Nous avons donc dû abandonner cette option.

Les deux approches que nous venons de voir se distinguent donc par la nature de la matrice isolante mais ont en commun le fait qu'elles visent toutes les deux à élaborer cette couche d'interface directement sous forme de membrane auto supportée pour ensuite la structurer (couche d'alignement sur une face), et l'intégrer au reste du dispositif (remplissage de la cellule suivi du scellement avec cette membrane). Les résultats obtenus se sont avérés assez peu compatibles avec de telles contraintes de manipulation et d'intégration. Des études supplémentaires auraient dû être conduites pour rendre ces solutions entièrement compatibles avec notre approche. Nous avons préféré, dans le temps imparti au développement de cette brique technologique, ne pas les conduire et plutôt essayer une approche, en apparence, plus facilement intégrable. Cette approche est décrite dans le paragraphe suivant.

4. Plots de PEDOT obtenus par photolitho-gravure dans une résine isolante

La structuration de PEDOT par les procédés de lithographie classique est une approche qui a été récemment explorée pour des applications dans le domaine de l'électronique organique notamment [162][163]. Nous nous sommes intéressés à ces procédés afin de les adopter à notre configuration, à savoir : structurer des plots de PEDOT sur un substrat de silicium avant de les encapsuler dans une matrice isolante et transparente. La membrane composite ainsi obtenue est libérée par l'amincissement de son substrat de silicium par une gravure en face arrière.

Nous avons alors réalisé les étapes technologiques schématisées Figure 47 :

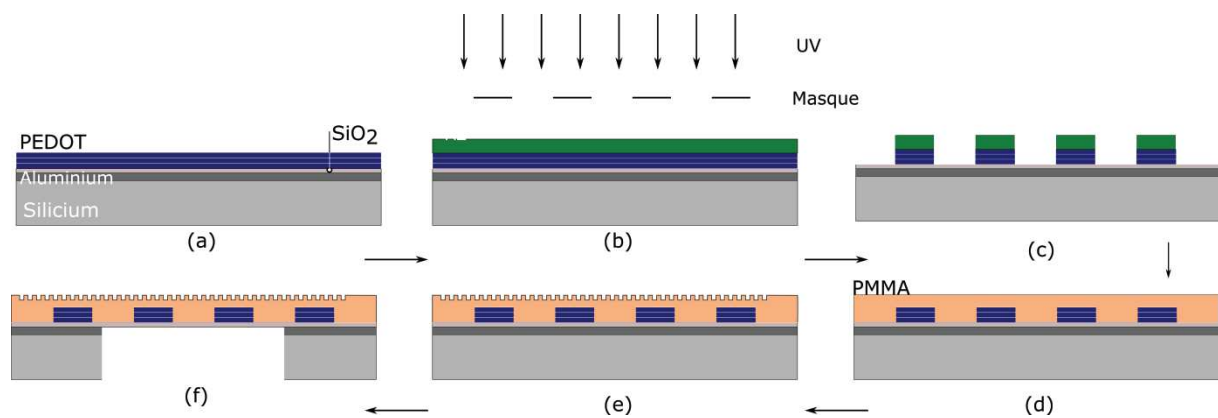


Figure 47 Etapes de fabrication de la membrane composite de plots de PEDOT encapsulés dans une matrice de PMMA. (a) Dépôt de 500 nm d'aluminium, 20 nm de SiO₂ et 120 nm de PEDOT-PSS par couches successives. (b) Etallement, insolation et développement de la résine pour obtenir le réplica du masque. (c) Gravure du PEDOT non protégé puis retrait de la résine. (d) Dépôt de 250nm de PMMA. (e) Impression des tranchées d'alignement des cristaux liquides par nanoimpression. (f) Ouverture du silicium en face arrière par DRIE, puis retrait de l'aluminium par gravure humide (alu etch).

Sur un wafer de silicium de 100mm de diamètre, nous commençons par déposer 500nm d'aluminium, par évaporation à canon à électron (MEB550, PLASSYS). Ce premier film est requis car il servira de couche d'arrêt (*etch stop layer*) lors de la gravure profonde en face arrière du silicium prévue en fin de process. Puis une fine couche de 20 nm de SiO₂ est déposée par pulvérisation cathodique, une méthode de PVD (Physical Vapor Deposition) pour favoriser l'adhésion du PEDOT-PSS qui s'est avérée être médiocre sur l'aluminium nu. Ensuite, une couche de PEDOT-PSS est déposée par spincoating. Le film formé, même à de faibles vitesses de rotation (1000rpm) est très mince (en moyenne 40nm, Figure 48). Pour des vitesses plus faibles, l'épaisseur du film n'est plus homogène. L'épaisseur du film formé est à relier directement avec la taille des particules de PEDOT-PSS, par conséquent il nous a été

nécessaire d'appliquer trois cycles consécutifs d'étalement par spincoating afin d'obtenir un film plus épais, conciliant sa tenue mécanique, le temps de fabrication (chaque couche de PEDOT déposée requiert un recuit intermédiaire de 20min pour évaporer l'eau ou les éventuels solvants) et la transparence optique des films formés (donnée apportée par le fournisseur Sigma-Aldrich).

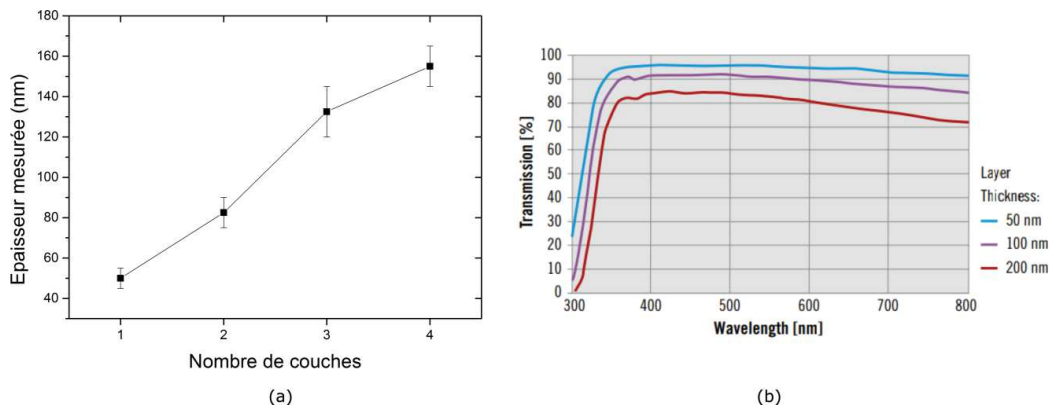


Figure 48 (a) Épaisseurs de films de PEDOT-PSS multicouches mesurées au profilomètre. Chaque couche a été déposée par spincoating à 1000tr/min pendant 60s et recuite à 150°C pendant 20min. (b) Transmission sur le spectre visible à travers différentes épaisseurs de films de PEDOT-PSS pour des solutions de PEDOT-PSS 1,3% wt, données du fournisseur Sigma-Aldrich.

Les plots de PEDOT sont ensuite élaborés grâce à une étape de photolithographie optique conventionnelle suivie d'une étape de gravure plasma sans difficulté particulière étant donné l'épaisseur relativement importante de la résine de masquage ($\sim 1,2\mu\text{m}$) en comparaison avec celle du PEDOT-PSS.

En utilisant un masque binaire de photolithographie préexistant au laboratoire, nous avons validé cette séquence de fabrication en élaborant un réseau de plots de PEDOT de $10\mu\text{m}$ espacés de $10\mu\text{m}$, d'environ 120nm d'épaisseur comme le montre la Figure 49. Même si ces dimensions ne sont pas optimales pour la résolution des cellules neuronales, les motifs ainsi réalisés, sans conception de masques dédiés, ont le mérite de permettre d'explorer cette variante technologique.

Une fois que les plots de PEDOT sont élaborés et que le résidu de la résine AZ1512HS, utilisée comme masque de gravure, est enlevé dans un bain d'acétone, l'étape d'encapsulation dans une matrice isolante est conduite (Figure 47 (d)). Pour ce faire, nous avons choisi une résine PMMA (poly methyl methacrylate). Le PMMA est en effet un polymère diélectrique et transparent. De plus, il possède de bonnes propriétés mécaniques [164] susceptibles de procurer une rigidité suffisante à cette interface composite de séparation entre les neurones et les cristaux liquides. Mais la motivation principale de ce choix réside dans le fait de permettre, à la fois, l'encapsulation des plots conducteurs de PEDOT dans un matériau isolant et d'imprimer au sein de ce même matériau les motifs d'alignement des cristaux liquides par une étape de nano impression thermique (Figure 47(e)). Afin de réussir ce double objectif, il nous a fallu déposer une couche de PMMA 2 à 3 fois plus épaisse que les motifs PEDOT. Cette condition était nécessaire pour que les motifs d'alignement de cristaux liquides soient uniformément imprimés aussi bien au-dessus des plots PEDOT qu'en dehors. Ceci est clairement visible sur la Figure 49 (d) où les motifs d'alignement de cristaux liquides (réseau iso-dense de lignes de 250nm de largeur espacées de 250nm) imprimés dans un film de PMMA de 250nm d'épaisseur, selon la procédure de nanoimpression thermique détaillée à la partie III.A du chapitre 2, sont correctement imprimés sur les différentes zones du dispositif.

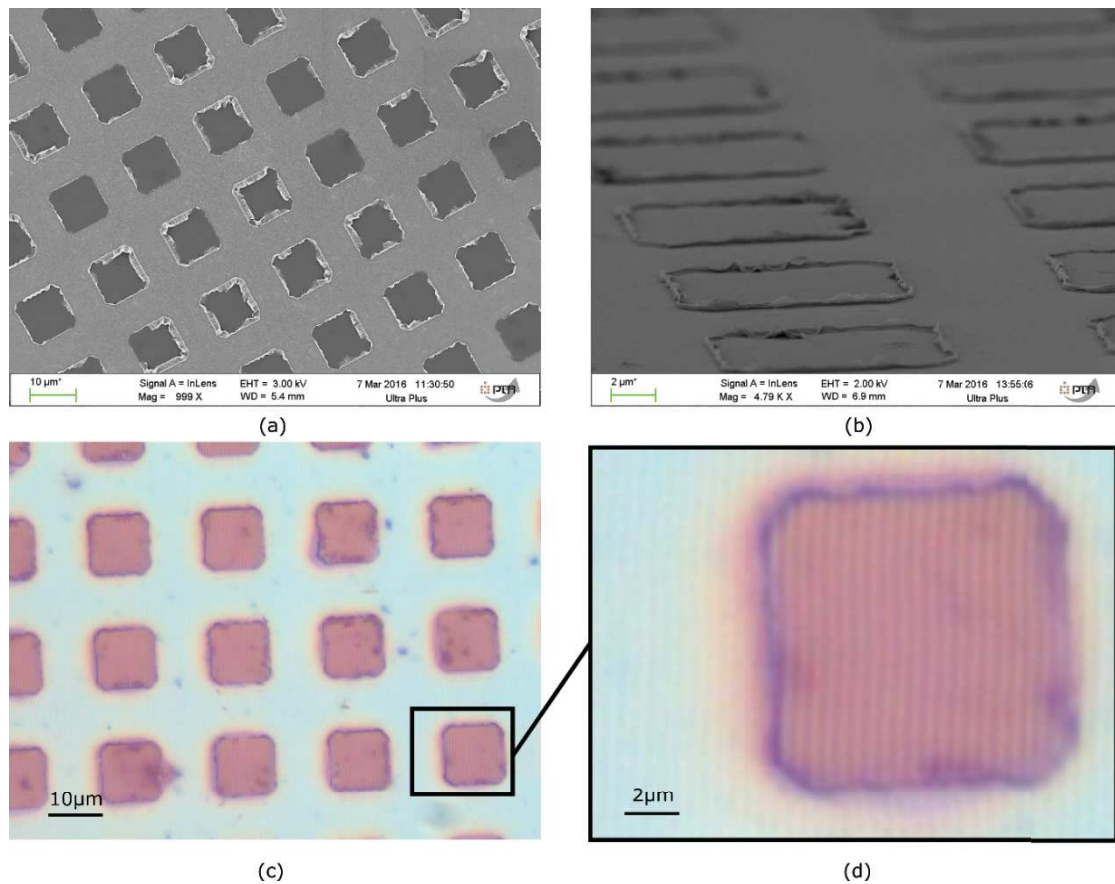


Figure 49 (a)(b) Clichés MEB des structures de PEDOT obtenues par lithographie optique. (c) Image en microscope optique des structures de PEDOT recouvertes de PMMA. (d) on distingue les motifs d'alignement des cristaux liquides (lignes 250nm espacées de 250nm) réalisées dans le PMMA par nanoimpression.

Un dernier niveau de lithographie est opéré en face arrière des wafers (Figure 47(f)) afin d'y délimiter des fenêtres de $0,5 \times 1 \text{ cm}^2$ et d'entreprendre par un procédé DRIE (Deep Reactive Ion Etching) l'évidement du silicium massif en dessous de la membrane composite ainsi structurée. Cette gravure profonde et anisotrope présente une forte sélectivité par rapport à l'aluminium, qui sert alors de couche d'arrêt de la gravure. L'aluminium doit ensuite être retiré par gravure humide avec une solution d'aluminium-etch, présentant à son tour une très bonne sélectivité par rapport au SiO_2 . Néanmoins cette étape n'a pas pu être réalisée car la membrane obtenue sur la zone gravée par DRIE présente d'ores et déjà un défaut de flambage comme nous pouvons le voir sur la Figure 50. Cet effet est très probablement dû aux contraintes résiduelles induites dans le film d'aluminium pendant son dépôt sur le substrat de silicium et à l'impossibilité de compenser de telles contraintes avec le film composite PEDOT-PMMA ainsi élaboré. Il aurait en effet fallu soit disposer d'épaisseurs de polymères (PEDOT et PMMA) plus importantes permettant de rigidifier davantage la membrane composite soit d'ajuster la composition de la matrice isolante afin de contrer le flambage des membranes libérées. Ces deux pistes nous ont semblé relativement difficiles et nécessitant des développements technologiques laborieux pour lesquels il nous était difficile de consacrer des efforts suffisants dans le cadre de cette thèse.

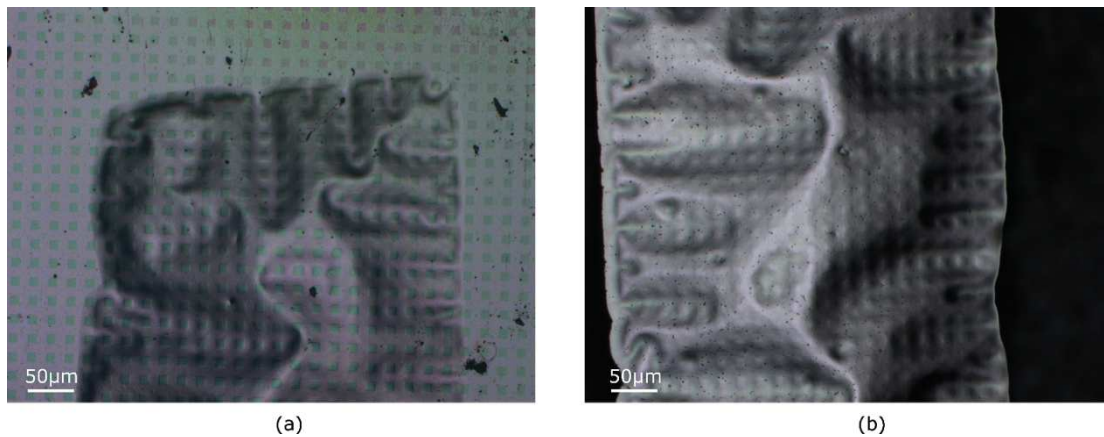


Figure 50 Images microscope de la zone libérée par gravure profonde. (a) Face avant, côté des motifs. (b) Face arrière, côté aluminium.

Néanmoins, à l'issue de cette troisième tentative d'élaboration de membrane composite, et malgré l'absence de réussite finale, nous avons considérablement amélioré notre approche sur les deux points suivants :

- i) Nous écartons définitivement l'usage de membranes composites auto supportées en raison de la difficulté à les insérer dans une démarche d'intégration plutôt longue et complexe (scellement, spincoating, etc.)
- ii) Nos étapes technologiques s'enchaînent correctement dans une suite d'opérations technologiques (dépôts, spincoating, recuits thermiques, lithographie en faces avant et arrière des substrats, nanoimpression thermique, gravures plasma et humide) relativement standards.

Nous avons alors adopté cette approche avec comme matériaux conducteurs les nanofils de silicium.

B. Nanofils de Silicium encapsulés dans une matrice isolante

L'avantage principal escompté de cette option réside dans le fait que les nanofils de silicium présentent intrinsèquement de meilleures propriétés mécaniques que celles du polymère conducteur utilisé jusqu'à alors. Et, a minima, il nous était envisageable de viser des épaisseurs finales plus importantes (de l'ordre du micron voire plusieurs microns) conférant à l'interface composite finale la rigidité et la planéité requises pour la cellule des cristaux liquides.

Un dernier attrait, et pas le moindre, réside dans le fait que les techniques d'élaboration de nanofils possèdent plus de marges de manœuvre que celles des brins de polymères conducteurs, permettant de la sorte, de se rapprocher des paramètres optimisés issus de nos simulations (voir chapitre2).

Il existe plusieurs méthodes pour élaborer des nanofils de silicium verticaux, qui peuvent être regroupées en deux catégories : l'approche ascendante (ou *bottom-up*) ou descendante (*top-down*)

Ces deux approches font partie intégrante du savoir-faire technologique du LTM. Nous les avons alors évaluées pour statuer sur leurs capacités à répondre à notre cahier des charges

1. Nanofils de Silicium par croissance CVD

Ce procédé, de type *bottom-up*, souvent appelé, VLS (Vapeur Liquide Solide) se déroule dans un bûtit de dépôt chimique en phase vapeur (CVD pour Chemical Vapor Deposition [131]). Cette méthode de synthèse consiste à faire croître des nanofils à partir d'un catalyseur métallique, dans notre cas des nanoparticules d'or déposées sous forme de colloïdes de 100nm de diamètre sur un substrat de

silicium. Le substrat est alors introduit dans le réacteur et porté à 600°C par flux d'hydrogène (1400sccm, 3Torr) et le gaz précurseur contenant le silicium, du silane SiH_4 , est envoyé à la surface du catalyseur avec un débit de 40 sccm. Celui-ci se charge alors en silicium, formant un alliage Au-Si. L'apport constant de silicium dans cette gouttelette pousse l'excédent du silicium à cristalliser à l'interface entre la goutte et le substrat. Au fur et à mesure de l'incorporation de silicium, un nanofil cristallin croît sous la goutte d'or. Les étapes de la croissance sont schématisées Figure 51 (a-d).

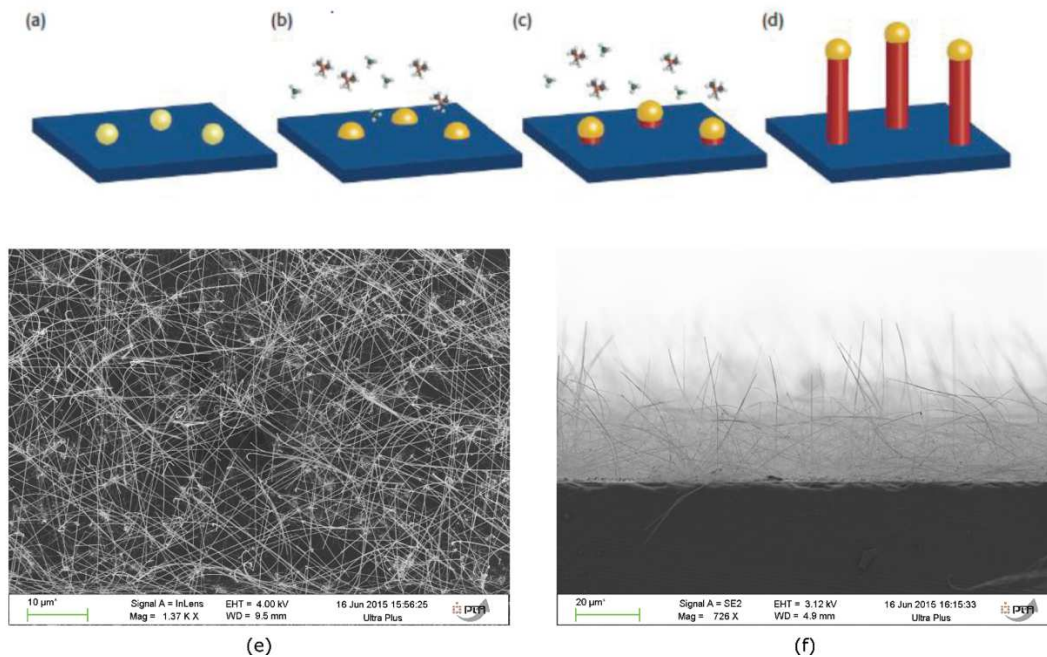


Figure 51 Mécanisme de croissance des nanofils de silicium par CVD. (a) Dépôt de colloïdes d'or, catalyseurs. (b) Chauffage du substrat et envoi de gaz précurseur contenant du silicium. (c) Formation de l'alliage Au-Si, saturation de la goutte, et cristallisation à l'interface goutte-substrat. (d) Croissance des nanofils (adapté de [165]). Clichés MEB des nanofils obtenus (e) vue de dessus, (f) vue en coupe.

Nous avons sollicité nos collègues de l'équipe Nanomatériaux et Intégration (Bassem SALEM et Thierry BARON) afin d'avoir des échantillons de réseaux de nanofils Si crus par VLS répondant aux critères dimensionnels de notre cahier des charges (longueur, diamètre, espacement). Sur la Figure 51 (e,f), nous illustrons la morphologie typique des échantillons mis à notre disposition, s'approchant le plus de nos critères. Si la longueur de fils individuels dépasse aisément les 20 microns, leur orientation, flexibilité et densité s'avèrent être non conformes à nos besoins.

2. Nanofils de silicium par gravure profonde (Procédé Bosch)

Nous nous sommes alors dirigés vers une approche traditionnellement utilisée en microélectronique, désignée comme descendante, ou *top down*. Elle consiste à réaliser une séquence lithographie-gravure où l'étape de lithographie définit les dimensions et la densité des nanofils recherchés et celle de la gravure leur hauteur et inclinaison. Ces nanofils ont été réalisés en collaboration avec le CEA LETI où la lithographie a été réalisée en utilisant un masque de réseaux hexagonaux de plots de 250nm de diamètre. Après leur révélation dans la résine photo-lithographique (M78Y), ces motifs sont transférés dans un premier temps dans un film mince de SiO_2 (50nm) sous-jacent qui servira comme masque à la gravure pendant l'étape de gravure profonde du silicium. Cette dernière est réalisée dans un bâti de Deep Reactive Ion Etching selon le procédé Bosch illustré Figure 52. Ce procédé de gravure par plasma consiste en une série de réactions de gravure du silicium grâce à une chimie fluorée (gaz réactif : SF_6), suivie d'une passivation par C_4F_8 générant un dépôt de CF_2 . Ce dépôt de passivation permet de

protéger les zones déjà gravées lors du prochain cycle de SF₆. Les cycles gravure/passivation sont alors répétés jusqu'à atteindre la profondeur souhaitée. La morphologie « en vague » du flanc de gravure que l'on peut observer sur les nanofils Figure 52 (d) est caractéristique de ce procédé Bosch et est appelé *scalloping*.

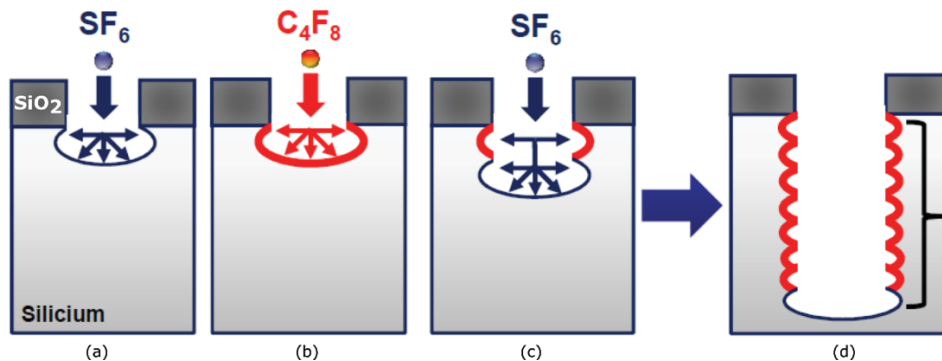


Figure 52 Principe de gravure profonde du Si via un masque SiO₂ par procédé Bosch. (a) Gravure du Si par SF₆. (b) Dépôt de passivation sur les flancs. (c) Gravure du silicium. (d) allure finale de la tranchée « Scalloping ». Adapté de [166].

Comme nos spécifications sur le dimensionnement du réseau de nanofils nécessitent un facteur de forme des fils élevé AR=40 (250nm de diamètre pour 5 à 10µm de long), il a fallu plusieurs étapes de mise au point de ce procédé de gravure. Avec les 10µm de longueur visés, les premiers nanofils obtenus présentés Figure 53 ne sont pas complètement optimisés. Leur diamètre est inférieur aux 250nm visés, ce qui a tendance à les fragiliser par endroit. Ces premiers échantillons nous ont néanmoins permis de réaliser les premiers essais d'encapsulation, tout en poursuivant la mise au point de la recette de gravure.

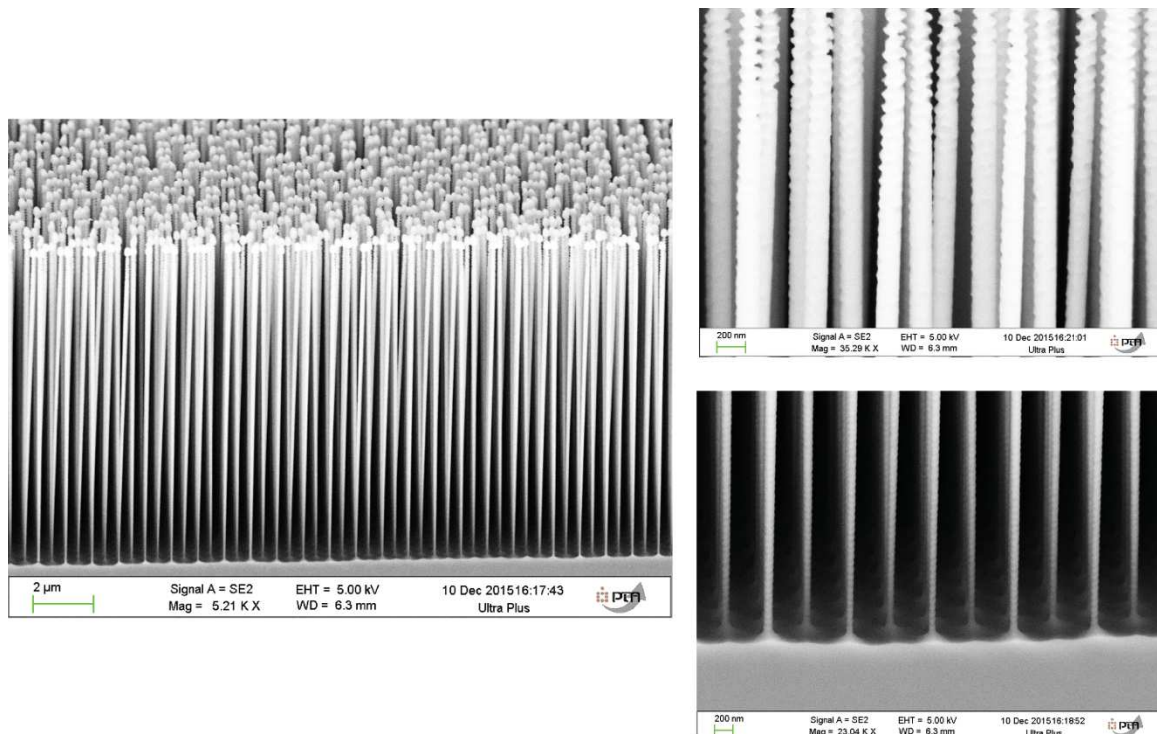


Figure 53 Clichés MEB des premiers nanofils de Silicium obtenus par procédé Bosch en gravure profonde DRIE. Les clichés de droite concernent respectivement la tête et la base des nanofils.

3. Encapsulation des nanofils de Si dans une matrice isolante

L'encapsulation de nanofils verticaux par une couche isolante est une étape qui a déjà été explorée en microélectronique notamment pour l'isolation des contacts entre la grille et le drain de transistors à nanofils verticaux par exemple [167],[168] ou encore pour des applications en optoélectronique [169] ou dans le domaine du photovoltaïque [170].

Une méthode fréquemment utilisée consiste à déposer une couche de SOG (spin-on-glass) ou de polymère par spincoating. Ce fut la première méthode que nous avons testée, avec un polymère que nous avons déjà à disposition, nommé Accuflo de chez Honeywell. Or, ce polymère ne se dépose qu'en couches très minces (400nm à 1000rpm) par rapport à la hauteur de nos fils et aurait nécessité un dépôt de plusieurs couches successives pour encapsuler les nanofils sur toute leur longueur ce qui est probablement prohibitif. Un premier essai a confirmé nos craintes comme le montrent les clichés MEB Figure 54 obtenus après un premier dépôt d'Accuflo par spincoating. On constate que les nanofils se sont agglomérés en paquets de centaines de nanofils probablement sous l'effet des forces de centrifugation lors de l'étalement du polymère.

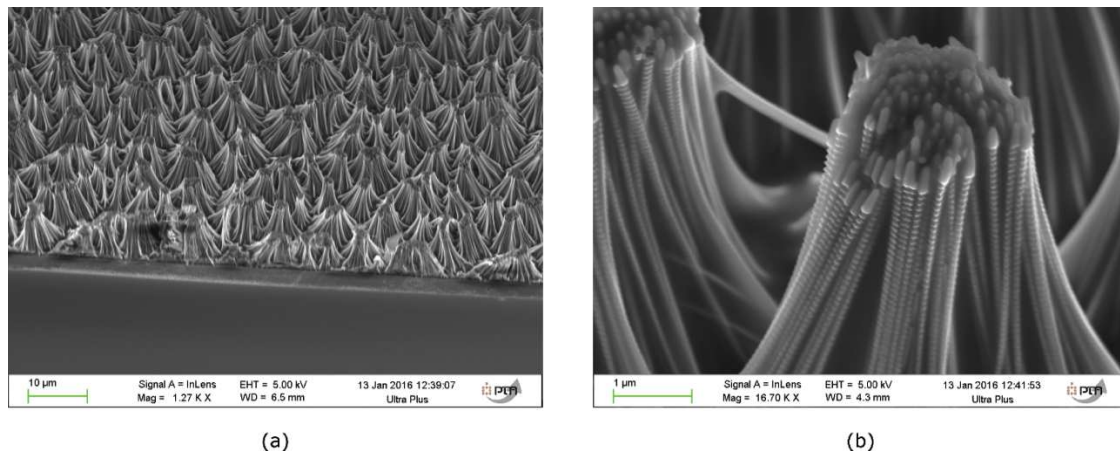


Figure 54 Nanofils de silicium après dépôt et étalement d'une première couche d'Accuflo par spincoating. (a) Vue d'ensemble. (b) Agrandissement sur un paquet de nanofil formé.

Cette première observation nous a poussés à rechercher des matériaux polymères présentant une plus grande viscosité ou en tout cas qui pourraient être déposés en une seule couche d'épaisseur égale à celle des nanofils. Nous avons alors testé l'encapsulation des nanofils avec une résine bien maîtrisée au laboratoire, à savoir la SU8, par spincoating en laissant bien sédimenter la résine avant l'étalement. Sur un même échantillon, les observations de l'imprégnation de la SU8 sont assez disparates comme le montrent les clichés MEB de la Figure 54. Par endroit, l'observation sur la tranche indique que la résine semble avoir correctement pénétré jusqu'à la base des nanofils, et les encapsuler complètement (Figure 54 a). Ailleurs sur le même échantillon, la résine semble au contraire rester en top-couche sur la tête des nanofils (Figure 54 b). De plus, quand on observe l'échantillon à 45° de manière à explorer la surface, on constate que, à de nombreux endroits, les nanofils émergents de la couche de résine semblent avoir également formé des paquets. (Figure 54 c et d). Ces agglomérats semblent moins importants que dans le cas de l'Accuflo (une dizaine de nanofils seulement), mais nous poussent à penser que la forte densité et le facteur de forme élevé de nos nanofils limitent une encapsulation correcte par un matériau liquide. Les fils, fragilisés, semblent en effet s'attirer par capillarité au contact du liquide déposé.

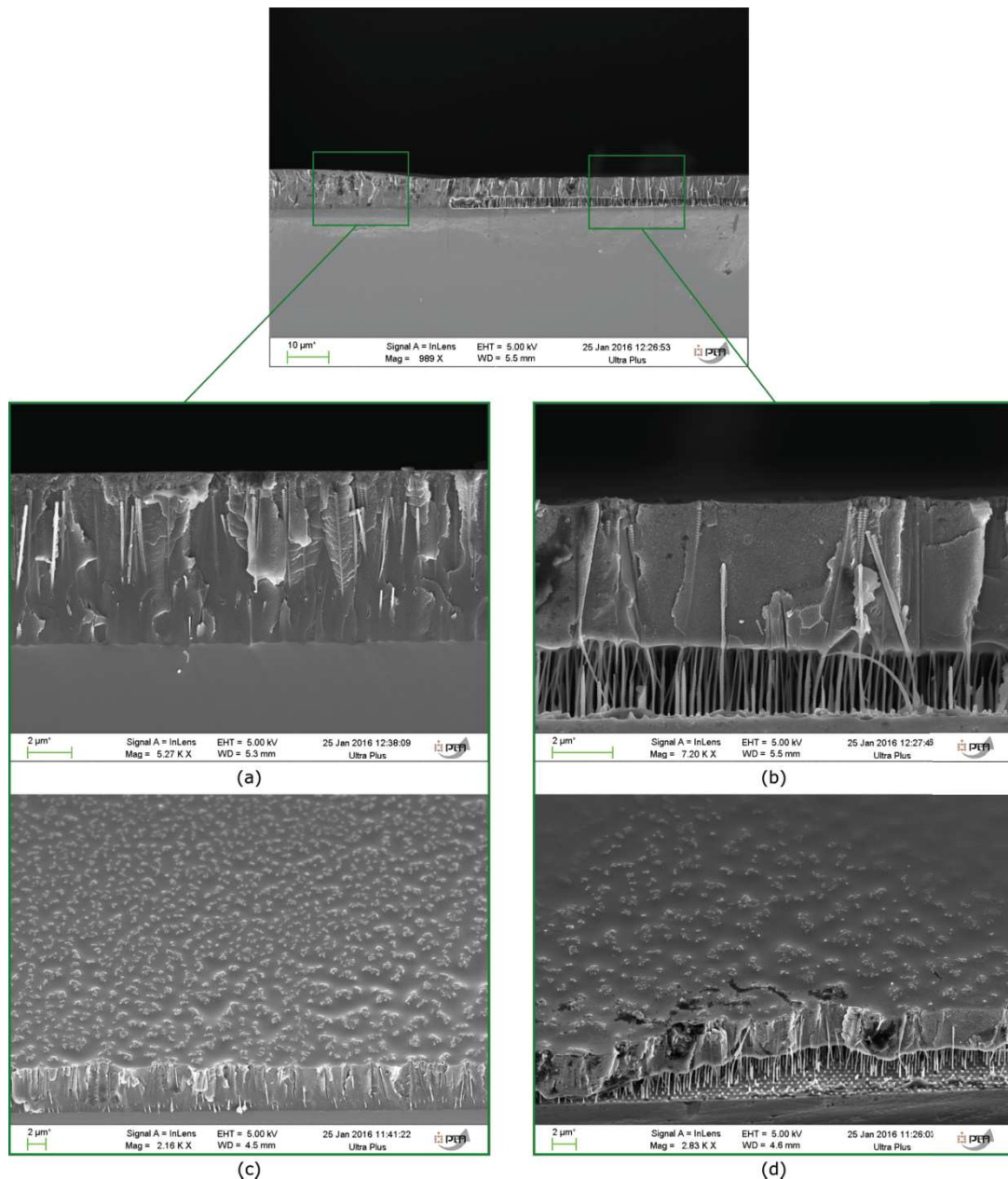


Figure 55 Nanofils de Silicium après encapsulation par la résine SU 2005 pour différentes zones. (a) observation en section droite montrant une encapsulation satisfaisante et (b) un endroit où la résine SU8 n'a pas pénétré la forêt des nanofils. (c) et (d) : observation en MEB tiltées à 45° des deux endroits respectifs montrant un défaut de collage de nanofils à leurs sommets.

Nous nous sommes donc orientés vers une autre méthode d'encapsulation consistant à déposer l'isolant en phase vapeur pour essayer de contourner ces limitations. De par ses propriétés de transparence optique, de bonne tenue mécanique et de biocompatibilité [171] le parylène déposé par VDP (Vacuum Deposition Polymerization) s'est avéré être un excellent candidat pour l'encapsulation des fils. Ce procédé consiste à obtenir un monomère à partir de la sublimation puis de la pyrolyse d'un précurseur sous forme de dimère. Le gaz de monomère à haute température polymérise ensuite en s'adsorbant à la surface du matériau à revêtir, resté à température ambiante, en formant un film continu de parylène. De par leurs propriétés uniques citées plus haut, ces films de polymère sont aujourd'hui très utilisés dans les biotechnologies[172][173] et la microélectronique [174].

Les dépôts ont été réalisés en collaboration avec l'équipe TPS de l'institut Néel. Il existe plusieurs types de parylène, celui qui s'est avéré le mieux adapté pour notre application est le parylène VT4 (très

bonne conformité de dépôt et bonnes propriétés diélectriques)[175]. Les premiers essais présentés Figure 56 sont très prometteurs : les fils sont restés bien droits et n'ont pas collapsé. Les têtes, plus larges que la base des fils sont bien liées via la matrice de parylène alors que l'espacement entre fils, dans la partie inférieure, n'est pas entièrement comblé par ce simple dépôt

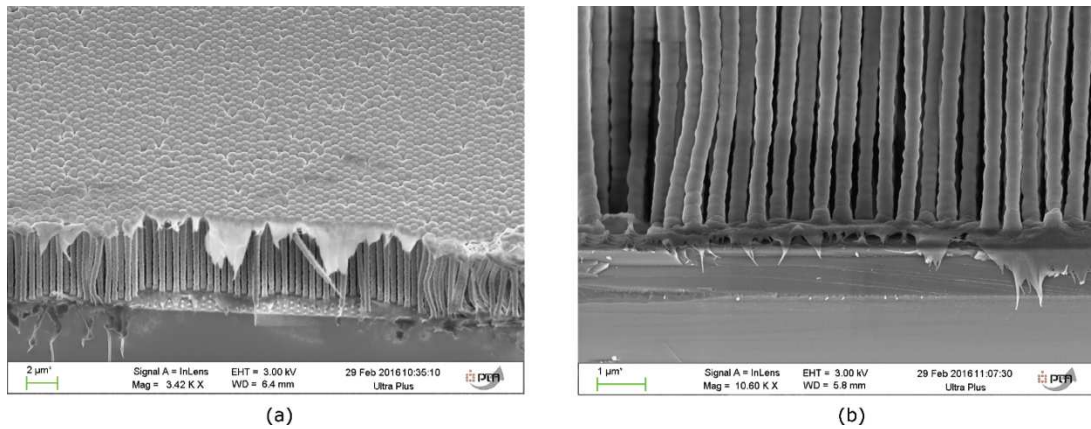


Figure 56 Encapsulation des nanofils de silicium (non optimisés) par du parylène VT4. (a) Vue à 45°. (b) Agrandissement sur la tranche de la base des fils.

Ce dépôt a ensuite été effectué sur les nanofils gravés optimisés (diamètre ~ 230 nm uniforme sur toute la longueur des fils $\sim 5\mu\text{m}$) présentés Figure 57 (a) et (b). Dans ce cas, les résultats sont conformes à nos attentes : le parylène recouvre de façon conforme et uniforme les fils sur toute leur hauteur assurant une matrice composite continue (Figure 57 (c) et 16 (d)).

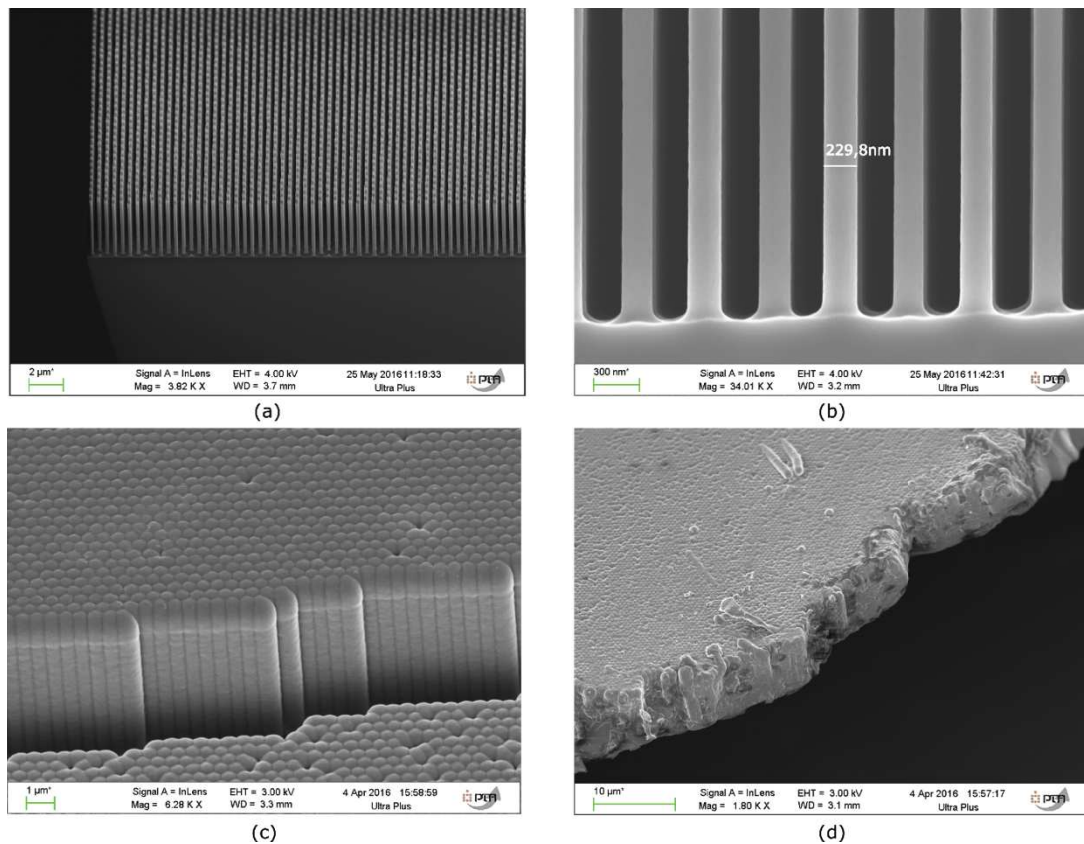


Figure 57 Nanofils de silicium obtenus par procédé de gravure Bosch après optimisation de la recette de gravure (a) et (b). Encapsulation de ces nanofils par 400nm de parylène VT4 (c). Vue d'une partie du film formé (d).

La conformité et l'épaisseur adaptée du dépôt de parylène permet de former un film continue comme illustré Figure 57 (d), prise à un endroit où une partie du film composite nanofils de silicium/parylène s'est détachée.

Nous avons alors entrepris de valider la compatibilité de cette membrane composite avec les deux autres séquences technologiques :

- i) La possibilité d'imprimer, sur sa face supérieure les microcanaux d'alignement de cristaux liquides dans un film de PMMA. Cette étape a correctement abouti comme nous pouvons le voir sur l'image au microscope optique Figure 58(a) qui montre les canaux d'alignement sur la face avant du film de parylène.
- ii) L'ouverture en face arrière par gravure sèche pour libérer la membrane sur une surface de ≈ 1 mm². Cette séquence a été réalisée en deux étapes : une première étape de gravure profonde DRIE visant à graver une épaisseur importante de silicium (680 μ m) puis une étape de RIE permettant de graver plus lentement l'épaisseur restante du substrat jusqu'à déboucher sur le parylène. La Figure 58 (b) montre une vue au microscope optique de la face libérée : la membrane obtenue présente des craquelures, et le parylène semble avoir été altéré.

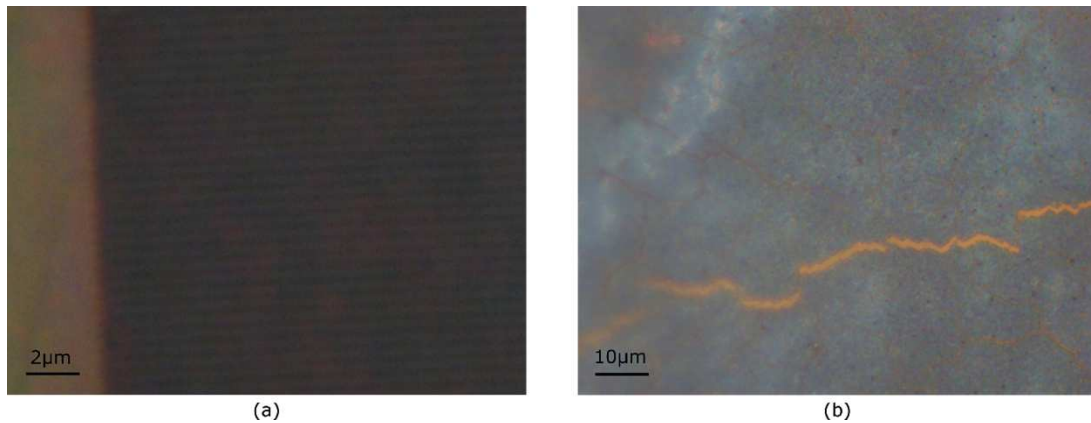


Figure 58 Structures d'alignement des cristaux liquides (lignes de 250 μ m espacées de 250 μ m imprimées dans le PMMA) à la surface des nanofils de silicium encapsulés dans le parylène (face avant). (b) Surface de la zone ouverte en face arrière.

Cette approche prometteuse aurait nécessité davantage de développement pour parvenir à répondre entièrement au cahier des charges de l'interface. Par exemple, l'ajout, en dessous de cette interface, d'un film d'arrêt de gravure aurait facilité sa libération en gravure sèche ou humide, tout en préservant son intégrité, mais aurait perturbé la gravure des nanofils.

D'autres méthodes ont été testées afin de libérer la membrane de son substrat : nous avons essayé de la retirer en la décollant par *peeling off*, ou en la transférant sur une bande adhésive mais aucune de ces solutions n'a été probante, soit parce que la membrane ne se décollait pas du substrat, soit parce qu'elle finissait systématiquement détériorée.




Par ailleurs, en parallèle à ces développements technologiques exploratoires pour la fabrication d'interfaces composites et devant les difficultés intrinsèques de chacune des solutions explorées, nous nous étions assez vite résolus à considérer la deuxième approche basée sur l'usage d'un matériau homogène pour l'élaboration de cette interface neurones/cristaux liquides. Cette deuxième solution a porté ses fruits assez rapidement et s'est avérée être plus compatible avec la séquence d'intégration que toutes les approches examinées auparavant. C'est alors dans ces circonstances que nous avons choisi d'écarter la stratégie d'interface composite pour nous consacrer pleinement sur l'interface uniforme.

Conclusion de la partie II

Dans cette partie, nous avons entrepris la fabrication de l'élément clé du dispositif : la couche séparant les neurones des cristaux liquides. La stratégie adoptée consistait à élaborer un matériau composé d'un ensemble d'éléments conducteurs répartis dans une matrice d'un matériau isolant. Deux matériaux principaux ont été retenus comme élément conducteur de cette interface hybride : le PEDOT, un polymère conducteur transparent et des nanofils de silicium. Différentes approches ont été sondées pour d'une part associer cet élément conducteur avec une matrice isolante, d'autre part structurer la couche composite ainsi formée avec les motifs d'alignement des cristaux liquides, et enfin la libérer d'un éventuel substrat et/ou pouvoir la manipuler afin de l'assembler au reste des éléments du dispositif. Les stades d'avancement de ces différentes étapes de fabrication sont résumés dans la Tableau 6 ci-dessous pour chacune des voies explorées.

Tableau 6 Tableau récapitulatif de l'avancement des étapes de fabrication pour chacun des matériaux explorés

Matériau testé / Étapes de fabrication	Élément conducteur :	Polymère conducteur : PEDOT			Nanofils de silicium	
	Matrice isolante :	Alumine nanoporeuse	Polycarbonate nanoporeux	PMMA	Résine (Accuflo ou SU8)	Parylène
Élaboration du matériau hybride						
Structuration par les motifs d'alignement						
Libération de la membrane						

	Étape explorée mais écartée en raison des difficultés d'intégration
	Étape non validée par manque de temps, potentiellement intéressante à exploiter
	Étape validée

Pour résumer, nous avons exploré un large panel de technologies. Après avoir évalué la complexité et le temps de mise en œuvre de chacune d'elle, nous avons finalement conclu qu'aucune de ces approches n'était convenable pour un développement abouti à l'échelle du laboratoire et d'un projet de thèse, et encore moins pour une intégration future dans un produit industriel, mêmes si certaines se sont avérées plus prometteuses que d'autres et mériteraient de s'y intéresser plus longuement. Ces constatations nous ont amenées à explorer la deuxième stratégie de fabrication de l'interface, présentée dans la deuxième partie de ce chapitre.

III. Interface homogène

On rappelle ici les spécifications requises pour l'interface neurones/cristaux liquides :

- Transmettre localement et « verticalement » les signaux électriques des neurones vers la couche sous-jacente de cristaux liquides.
- Être suffisamment transparente optiquement de manière à récolter les variations d'intensité optique sur le capteur imageur sans atténuation majeure.

- Assurer l’alignement des molécules de cristaux liquides : elle doit être suffisamment rigide et plane pour permettre de disposer d’une épaisseur uniforme et homogène de cristaux liquides et de garantir leur alignement.

Enfin, elle doit être compatible biologiquement avec les neurones et permettre leur viabilité pendant les durées pertinentes pour les observations courantes en neurosciences (typiquement une durée de 14 jours est requise pour atteindre la maturité des neurones utilisés dans notre application). Dans le cas du choix d’un diélectrique, cela implique d’avoir une membrane plane et uniforme autosupportée, suffisamment mince pour ne pas écranter le champ électrique. Notre choix s’est porté sur des membranes de nitrure de silicium pour les raisons détaillées ci-après.

C. Choix du diélectrique : le nitrure de silicium

1. Pourquoi le nitrure de silicium

La plupart des matériaux diélectriques utilisés dans le domaine de la microélectronique, tels que les oxydes de silicium ou de métaux, sont utilisés sous forme de films minces déposés par différentes techniques sur divers substrats. Ces films minces peuvent présenter des contraintes résiduelles inhérentes à leur procédé d’élaboration, ayant pour origine des facteurs multiples comme la température de dépôt, la vitesse de croissance, etc. Selon la technique de dépôt et les matériaux utilisés, ces contraintes résiduelles peuvent atteindre des valeurs plus ou moins importantes, parfois jusqu’à quelques GPa ce qui peut provoquer le décollement, le flambage (comme nous avons pu le voir sur la membrane d’aluminium dans la A.4) ou encore la rupture du film lors de sa libération sous forme de membrane.

Le nitrure de silicium est un matériau diélectrique très apprécié dans le domaine des microsystèmes électromécaniques (MEMS) précisément pour ses possibilités de dépôt sous forme de film mince (μm) à faibles contraintes résiduelles (<math><600\text{MPa}</math>) [176][177], permettant la réalisation de membranes autosupportées.

Notre choix s’est porté sur des membranes en nitrure de silicium précisément pour ses propriétés de transparence optique et la possibilité de dépôt à faible contraintes résiduelles sur les plateformes technologiques disponibles au laboratoire.

2. Dépôt de SiN par LPCVD

Les films minces de nitrure de silicium ont été fabriqués sur la plateforme technologique LETI sur des substrats de silicium $\langle 100 \rangle$ de 200 mm de diamètre et de 725 μm d’épaisseur. Ils ont été déposés par un procédé LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition) dans la machine VT400 en utilisant un mélange de gaz Amoniac (NH_3) / dichlorosilane (DCS ou $\text{H}_2\text{Cl}_2\text{Si}$) à une température de 800°C et une pression de 175mTorr. La configuration du réacteur est telle que les plaques de silicium processées le sont sur leurs deux faces. Plusieurs épaisseurs ont été testées, les ratios de gaz et les contraintes résiduelles correspondantes sont résumées dans le ci-dessous.

Tableau 7 Paramètres de dépôt LPCVD des couches minces de SiN

Epaisseur Visée (mesurée*)	Ratio de gaz NH_3/DCS (sccm)	Temps de dépôt	Contrainte résiduelle
100 nm ($106 \pm 5\text{nm}$)	21/140	46 min	300 MPa
300 nm ($283 \pm 6\text{nm}$)	21/140	120 min	300MPa
500 nm ($487 \pm 12\text{nm}$)	21/140	208 min	300 MPa
800 nm ($793 \pm 19\text{nm}$)	21/104	346 min	550 MPa

*L’épaisseur a été mesurée par ellipsométrie spectroscopique sur différentes zones du wafer.

D. Libération des membranes : approche conventionnelle

1. Rappels sur les procédés de gravure pour la fabrication de membranes

Une fois le nitrure de silicium déposé, il faut procéder à la libération des membranes par l'enlèvement du silicium sous-jacent via une gravure profonde en face arrière du substrat. Il faut alors commencer par ouvrir une fenêtre dans le nitrure du silicium en face arrière en gravant le nitrure à travers un masque par IBE : Ion beam etching ou RIE Reactive Ion Etching par exemple. Il faut ensuite procéder à la gravure du silicium soit par voie sèche (DRIE ou RIE), soit par voie humide.

Les gravures par voie sèche (RIE ou DRIE) permettent d'accéder à des cinétiques de gravure de silicium relativement importantes (en moyenne $13\mu\text{m}/\text{min}$ pour la gravure de silicium par DRIE, permettant de graver la totalité de l'épaisseur du substrat soit $725\mu\text{m}$ en moins d'une heure). Leurs limitations résident dans leur manque de sélectivité nécessitant l'usage de couches d'arrêt (et/ou de couches protectrices des flancs de gravure) pour pallier au manque de sélectivité et ne pas endommager la membrane en fin de gravure.

Habituellement, les membranes de nitrure sur silicium utilisées pour les MEMS sont libérées en gravure humide du silicium dans des solutions basiques (telles que le Tétra Méthyl Ammonium Hydroxyde (TMAH) ou l'hydroxyde de potassium (KOH)) connues pour attaquer le silicium d'une façon anisotrope. Leur principal avantage est de permettre une excellente sélectivité de gravure entre le silicium et ses diélectriques usuels qui sont l'oxyde et le nitrure de silicium (la vitesse de gravure du SiN dans le KOH ou le TMAH est mille fois inférieure à celle du silicium [178]).

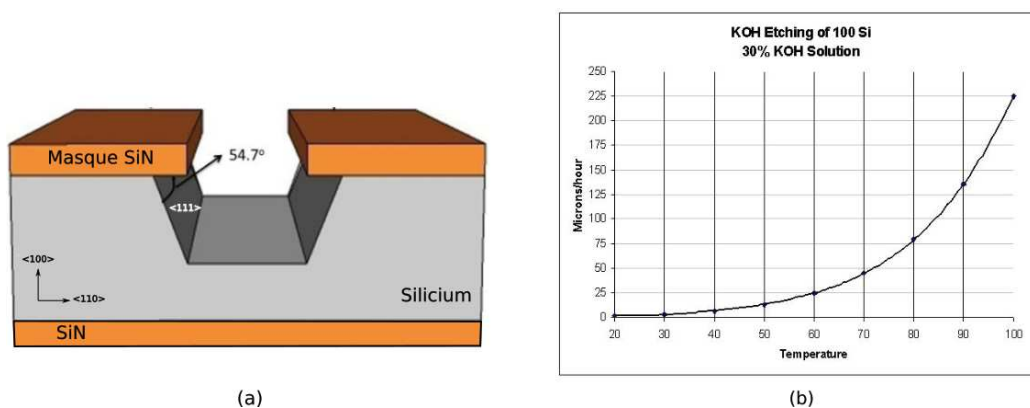


Figure 59 (a) Fabrication de membranes de SiN par gravure chimique anisotrope de silicium <100> dans une solution de KOH. (b) Vitesse de gravure du silicium <100> par une solution de KOH concentrée à 30% en fonction de la température.

La vitesse de gravure du silicium par le KOH est anisotrope et dépend de l'orientation cristalline du substrat. Pour un substrat de type <100> la vitesse de gravure des plans <100> peut être jusqu'à 200 fois supérieure à celle obtenue selon les plans <111> [178]. Les parois des cavités gravées dans des substrats Si <100> présentent une inclinaison de $54,7^\circ$ qui est directement liée à la structure cristalline de ces substrats et plus précisément à l'angle entre les plans cristallins <111> et <100> Figure 59 (a). La vitesse de gravure du silicium par une solution de KOH dépend par ailleurs de la concentration de la solution et de la température. Un exemple de cette cinétique de gravure est donné Figure 59 (b) pour une concentration de 30%.

2. Mise au point d'un procédé de fabrication adapté

➤ Libération de la membrane avant impression des structures

Les substrats de silicium dont nous disposons (wafer de 200mm) sont relativement épais ($725\mu\text{m}$) et nécessiteraient des temps de gravure très longs si on choisit la voie humide. Selon la courbe 19 (b) pour une solution de KOH à 30% chauffée à 70° , il nous faudrait environ 14h pour graver les $725\mu\text{m}$ de

silicium du substrat. Or, pour des durées aussi longues, les bancs de gravure chimique dont on dispose ne garantissent pas (en termes de régulation en température et de stabilité de composition) un bon contrôle de la cinétique de gravure.

Nous avons donc opté pour une combinaison des deux techniques de gravure, avec d'abord une gravure sèche en RIE pour retirer le nitrure sur la fenêtre voulue puis une étape de gravure profonde en DRIE pour enlever une grande partie de l'épaisseur du substrat de silicium (environ 600µm à 13µm/min en moyenne) et finalement une gravure humide en KOH pour enlever le reste de silicium (environ 125µm à 0,75µm/min) et libérer en douceur la membrane. L'échantillon est alors plongé dans un bûcher contenant une solution de KOH concentré à 30%, portée à 70°C à l'aide d'une plaque chauffante.

Les wafers de 200mm (LETI) dont nous disposons ne peuvent pas être manipulés tels quels dans le reste des équipements utilisés sur notre plateforme technologique (PTA) (chambres des bâtis de gravure RIE/DRIE ou bûchers pour des gravures humides) qui sont eux adaptés à des échantillons de petite taille ou à la filière 100mm. Les wafers 100mm sont également à exclure sur le bâti de DRIE disponible car la gravure n'est pas uniforme sur l'ensemble de la surface du wafer. Nous devons donc travailler sur de petits échantillons (environ 1 à 5cm² obtenus par clivage du wafer de silicium).

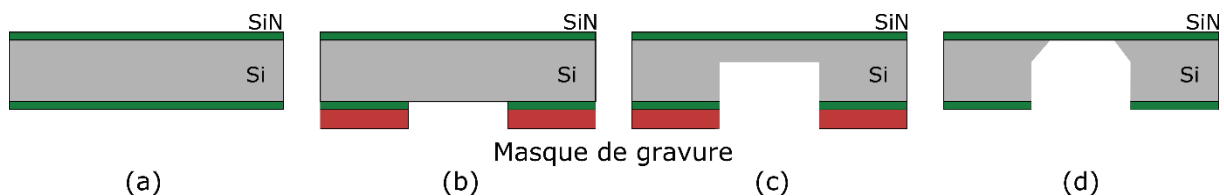


Figure 60 Étapes de fabrication de membrane de nitrure par combinaison des deux techniques de gravures (a) Découpe d'échantillons individuels par clivage des wafers de 200mm. (b) Gravure RIE du SiN au travers d'un masque polymère. (c) Gravure DRIE d'une partie du substrat de silicium (~600µm) sur la fenêtre ouverte. (d) Libération de la membrane par gravure KOH du silicium restant.

Nous obtenons des membranes bien planes sans fissures ou défauts (Figure 61 (a)) que nous avons directement confrontées à l'étape d'impression des canaux d'alignement des cristaux liquides pour examiner leur compatibilité avec les autres séquences de fabrication. Une couche de PMMA est alors déposée par spincoating puis les motifs sont imprimés par lithographie par nano impression, mais la membrane se fissure sous la pression de la presse du NIL, comme le montre la Figure 61 (b) et (c)

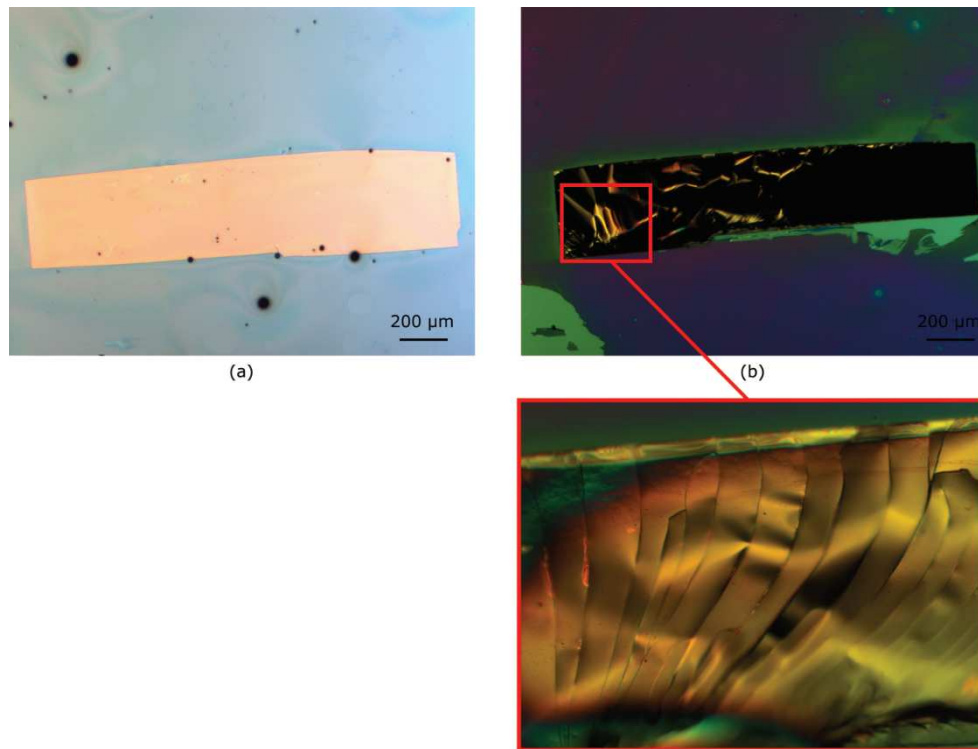


Figure 61 (a) Membrane SiN obtenue par combinaison de gravure DRIE et gravure KOH. (b) La même membrane endommagée après impression des structures d'alignement en PMMA par lithographie par nanoimpression et agrandissement d'une zone de la membrane.

Ce premier test nous a poussé à intégrer cette contrainte dans le procédé final de conception des membranes et de leur intégration au reste du dispositif : il faut en effet structurer la face avant du film de nitrure de silicium avec les canaux d'alignement en PMMA **avant** de libérer la membrane.

➤ *Impression des structures d'alignement avant la libération de la membrane*

Nous devons intégrer l'étape d'impression des motifs en face avant dans la séquence de fabrication technologique des membranes de nitrure de silicium.

Le PMMA n'étant pas compatible chimiquement avec la solution de gravure du silicium (KOH), cela implique de n'exposer que la face arrière à la solution de gravure. (*single-side etching*).

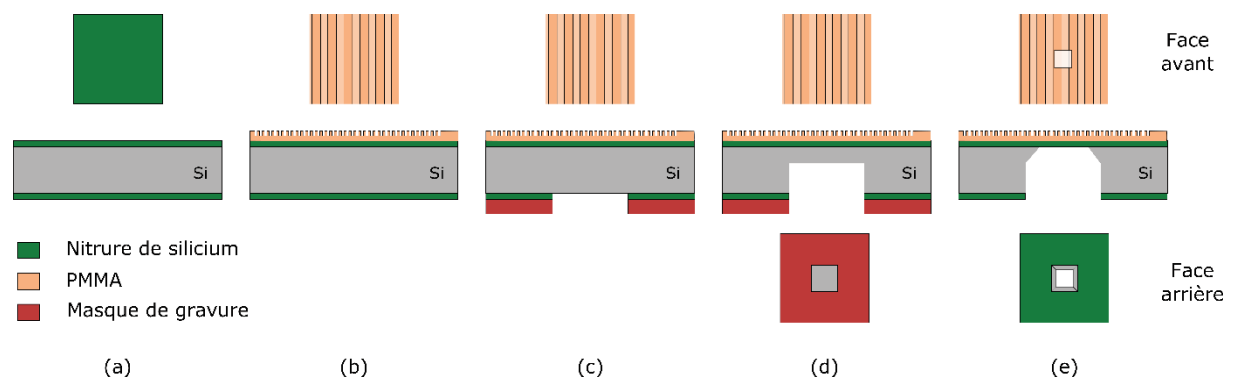


Figure 62 Etapes de fabrication de membranes de nitrure de silicium par combinaison de gravure sèche et humide et intégration de l'impression des structures en PMMA à la séquence. (a) Découpe d'échantillons individuels par clivage des wafers de 200mm. (b) Etalement de PMMA par spincoating en face avant et impression des structures d'alignement des cristaux liquides par lithographie par nanoimpression. (c) Ouverture d'une fenêtre par gravure RIE du SiN à travers un masque. (d) Gravure DRIE d'une partie du substrat de silicium (~600µm) sur la fenêtre ouverte. (e) Libération de la membrane par gravure KOH en face arrière uniquement du silicium restant.

Pour cela, nous avons dû mettre au point une cellule étanche qui contienne la solution de gravure sur une petite zone de la face arrière de l'échantillon. L'étanchéité est assurée par un joint torique et la solution de KOH est contenue dans une cellule en plexiglass résistante à cette dernière. Le KOH est chauffé au moyen d'une plaque chauffante sur laquelle on vient placer l'échantillon face PMMA en contact avec la plaque. Cette méthode nous a permis de libérer quelques membranes mais le mauvais contrôle de la température, le manque d'agitation et l'utilisation de trop petite quantité de KOH (changement important de la concentration en KOH) ne nous permettent pas de contrôler précisément les vitesses de gravure, ce qui conduit à un trop fort taux de perte des membranes, soit par casse, soit par endommagement du PMMA quand la température est trop élevée.

Cela nous a amenés à mettre au point un nouveau procédé détaillé ci-après, permettant de paralléliser la fabrication des membranes et de minimiser les pertes.

E. Optimisation du procédé de fabrication des membranes : usage de la gravure laser

1. Fabrication des membranes

Grâce à l'acquisition par le LTM en 2016 d'un instrument de gravure par faisceau laser « Tau Tech », nous avons pu améliorer la séquence de fabrication des membranes en termes de reproductibilité et de rapidité. Cet instrument permet d'enlever de la matière grâce aux interactions entre un laser pulsé à Ytterbium à 1064 nm et le matériau cible à condition que ce dernier soit absorbant à cette longueur d'onde (ce qui est le cas du silicium [179]). Par ailleurs, cet outil offre une surface de travail de 100x100 mm² ce qui nous permet de travailler sur un wafer entier de 100 mm de diamètre.

Les étapes mises au point pour la réalisation de membranes avec cet équipement sont résumées Figure 63 et détaillées ci-après.

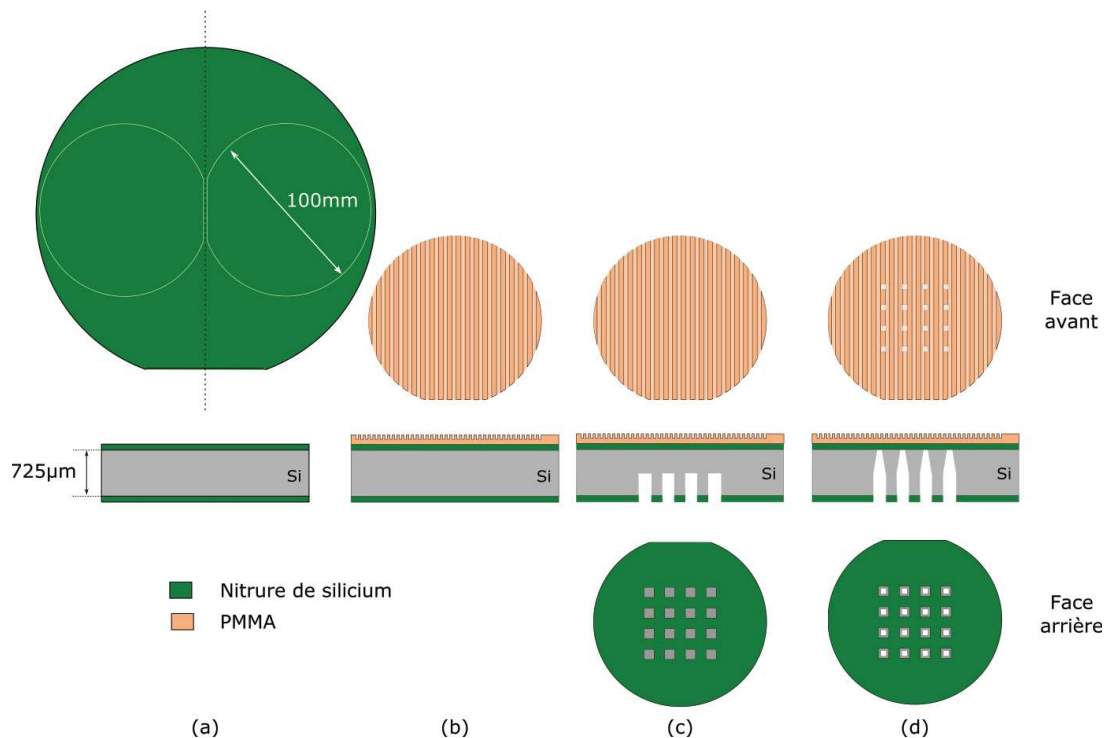


Figure 63 Schéma récapitulatif des étapes de fabrication collective et optimisées des membranes. (a) Découpe de deux wafer de 100mm de diamètre dans un wafer de 200mm. (b) Etalement de PMMA par spincoating en face avant et impression des structures d'alignement des cristaux liquides par lithographie par nanoimpression. (c) Ouverture de fenêtres par gravure laser du SiN et du Silicium en face arrière. (d) Libération des membranes en finissant la gravure du Si dans un bain de KOH 30% en protégeant la face avant.

- Deux formes de wafers de 100mm sont tout d’abord découpées via la gravure laser à partir de chaque wafer de 200mm recouvert de nitrure de silicium issu de la plateforme technologique LETI. Au préalable, ces wafers 200mm ont été clivés afin de bien identifier leurs axes cristallographiques de manière à aligner les méplats des wafers 100mm avec un plan cristallin Figure 63 (a).
- Les structures d’alignement des cristaux liquides sont ensuite imprimées dans une couche de PMMA déposée par spincoating en face avant des wafers 100mm. Figure 63 (b).
- Des préouvertures pour les membranes sont réalisées en face arrière (Figure 63 (c)) via la gravure laser. Un évidement de 600µm de profondeur est visé, ce qui permet de réduire au maximum les temps de gravure en KOH en aval (il reste alors 125µm de silicium à graver) sans risquer de déboucher ou de fragiliser le wafer. Selon les paramètres de la gravure laser résumés Tableau 8, 90 passages du faisceau laser ont été nécessaires pour atteindre la profondeur visée de 600µm. Le profil et l’état de surface d’un puits ouvert avec le laser sont présentés et discutés plus loin, Figure 65. Aucune étape de lithographie ou de masquage n’est nécessaire, le nitrure de silicium absorbant en partie dans l’infrarouge [180], c’est le faisceau laser qui grave à la fois le nitrure et le silicium.
Par ailleurs, un quadrillage qui doit permettre la découpe finale du wafer en échantillons unitaires après libération des membranes est dessiné en même temps que l’ouverture des puits. Les paramètres du faisceau laser restent les mêmes que pour l’évidement de matière, mais dans ce cas, un seul passage du laser suffit à tracer le chemin de découpe. De la même façon, les tailles et formes d’ouvertures des puits ainsi que le découpage des échantillons sont discutés plus loin dans cette partie.

Tableau 8 Paramètres du faisceau laser utilisés pour graver le silicium

Puissance moyenne du laser	Energie d’un pulse	Fréquence des pulses	Durée d’un pulse	Taille du spot
20 W	0,40 mJ	50 KHz	200 ns	35 µm

- Le wafer, structuré en face avant et pré-ouvert en face arrière suite aux étapes (a), (b) et (c), est ensuite placé et maintenu dans un *holder* (porte-wafer) qui protège la face avant et n’expose que la face arrière (Figure 64 (c)). L’étanchéité est assurée au moyen d’un joint torique. Puis le wafer, dans son *holder*, est plongé dans une solution de KOH (concentration 30%), portée à 70°C. Compte tenu du volume important de KOH nécessaire (il faut 1,8L de KOH pour immerger entièrement le wafer dans un bécher de 2L), nous avons choisi de chauffer la solution au moyen d’un bain marie pour plus d’homogénéité de chauffage (une plaque chauffante même avec l’aide d’un agitateur induirait un chauffage trop inhomogène de la solution). L’agitation est assurée manuellement et l’évaporation est limitée par la présence d’un couvercle fermant le bécher. Malgré ces précautions, nous avons constaté occasionnellement, que la gravure était légèrement inhomogène sur l’ensemble du wafer : les premières membranes débouchent après en moyenne 2h de gravure, certaines nécessitent quelques minutes supplémentaires.
Le wafer est ensuite clivé selon le quadrillage en échantillons unitaires prêts à être assemblés.

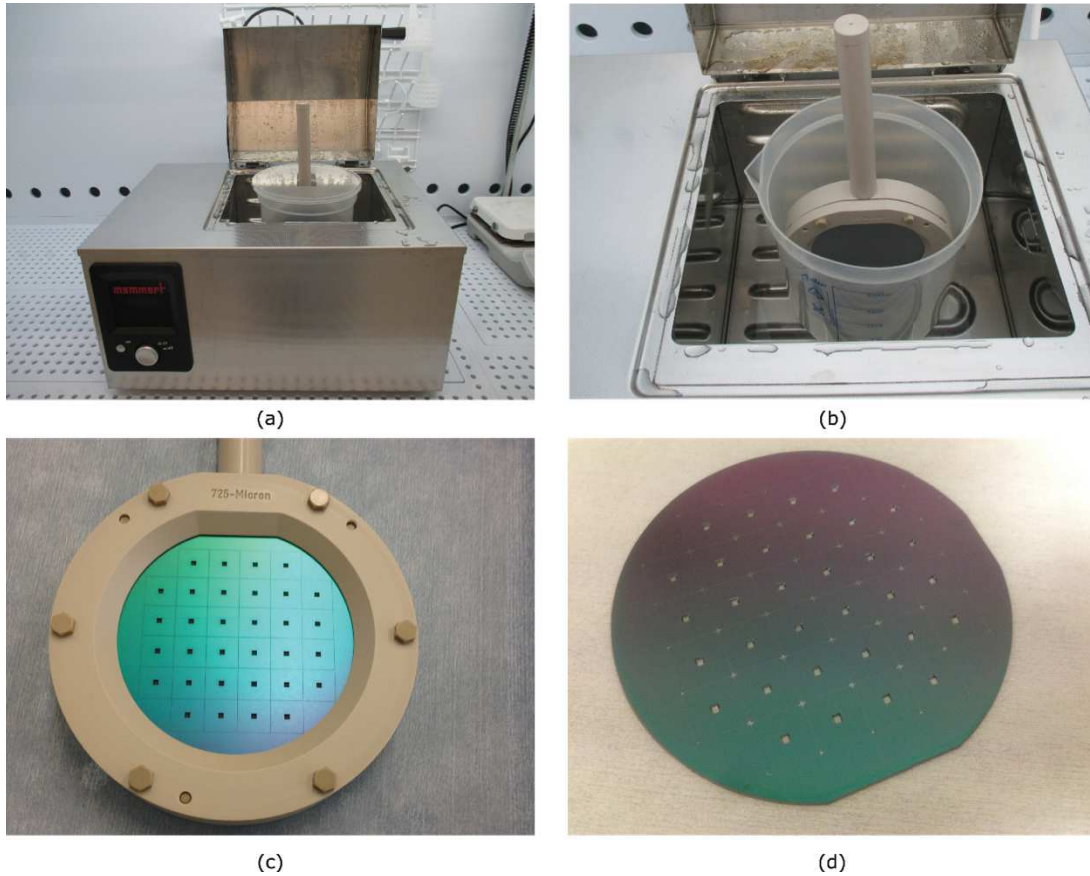


Figure 64 (a) et (b) Montage utilisé pour la gravure en KOH de la face arrière d'un wafer de silicium. Le wafer dans son holder est plongé dans un bécher rempli de KOH et fermé par un couvercle. Le bécher est placé au bain-marie. (c) Wafer 100 mm dans son holder protégeant la face avant (non visible) prêt à être graver en KOH après l'ouverture des fenêtres en gravure laser en face arrière (face visible). (d) Wafer après libération des membranes en KOH.

2. Caractérisation morphologique.

Le profil d'un puits ouvert par ablation laser est présenté Figure 65. Les flancs de l'ouverture ne sont pas parfaitement verticaux, un angle de 71° par rapport à l'horizontal est induit par le faisceau laser. La rugosité de la surface au fond du puits ouvert est de l'ordre de plusieurs μm (ici des écarts de $8,5 \mu\text{m}$ par rapport à la profondeur moyenne du puits sont observés). Fort heureusement, cette rugosité de surface sera gommée par la gravure KOH, et si besoin en sur-gravant quelques minutes supplémentaires. Il en est de même pour la rugosité des flancs.

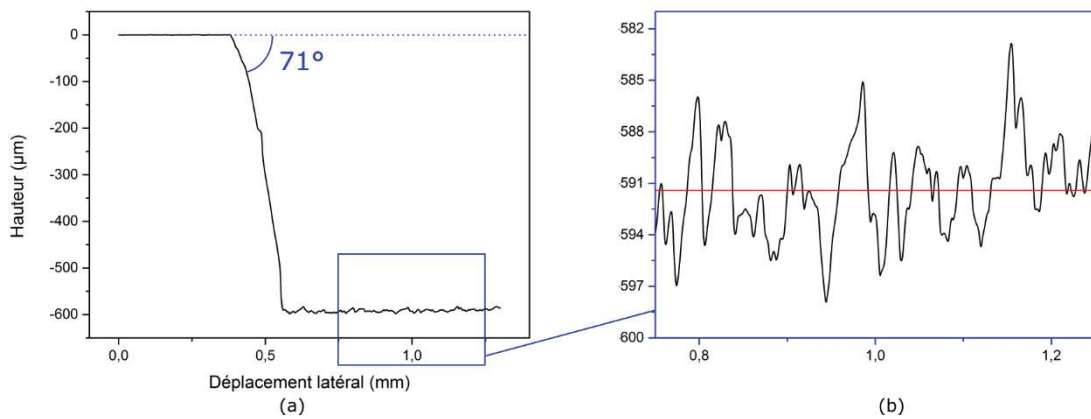


Figure 65 (a) Tracé au profilomètre du profil d'un puits obtenu par gravure laser. (b) Agrandissement sur le fond du trou pour mettre en évidence de la rugosité de surface obtenue.

Le profil d'un puits après libération complète de la membrane est donné Figure 66. La représentation schématique en (b) permet surtout de relier les dimensions des ouvertures depuis la fenêtre initiale (dessin sur le logiciel de gravure) jusqu'à la membrane après les gravures successives. Les flancs en bleu formés suite au passage du laser n'étant pas protégés, ils sont ensuite légèrement modifiés par la gravure KOH.

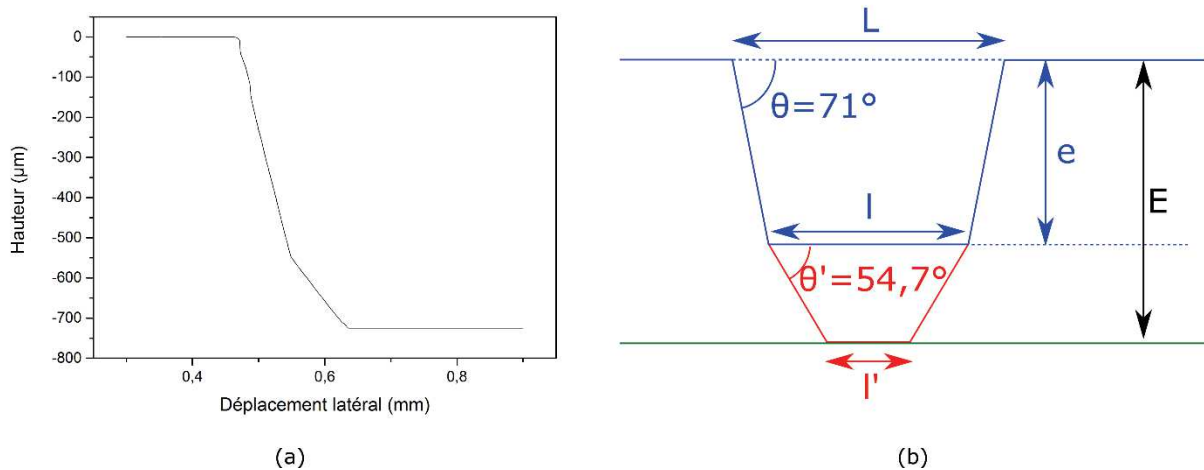


Figure 66 Profil d'un puits après ouverture par ablation laser et libération de la membrane en KOH. (a) Tracé au profilomètre sur un flanc. (b) Représentation schématique du puits entier après passage du laser (en bleu) puis gravure KOH (en rouge).

En négligeant ce dernier phénomène, nous pouvons extraire à partir du schéma simplifié de la Figure 66 deux relations géométriques principales :

$$l = L - 2e \tan\left(\frac{\pi}{2} - \theta\right) \quad (31)$$

$$l' = l - [2(E - e) \tan\left(\frac{\pi}{2} - \theta'\right)] \quad (32)$$

Ces équations nous permettent notamment de connaître l'ouverture réelle de la membrane, l' , après les deux gravures successives en fonction de l'ouverture initiale sur le dessin exécuté par l'outil d'ablation laser, L . Cela nous a permis de définir l'ouverture minimale requise initialement pour effectivement ouvrir une surface de membrane après les deux étapes de gravure combinées.

Pour avoir $l' > 0$, il faut :

$$L > 2(E - e) \tan\left(\frac{\pi}{2} - \theta'\right) + 2e \tan\left(\frac{\pi}{2} - \theta\right) \quad (33)$$

Soit pour $E = 725\mu\text{m}$ et $e = 600\mu\text{m}$, une ouverture large de :

$$L_{min} > 588\mu\text{m}$$

Nous avons travaillé avec plusieurs géométries de membrane au cours de cette thèse, mais sauf précisé autrement, les ouvertures en face arrière adoptées sont des carrées de $2 \times 2 \text{ mm}^2$ aboutissant, pour les profondeurs de gravure E et e considérées à des membranes de $1,5 \times 1,5 \text{ mm}^2$ (Figure 67(a)).

Quelle que soit la taille ou la forme de la membrane, tous les échantillons sont découpés selon des carrés de $12,5 \times 12,5 \text{ mm}^2$. Ces dimensions permettent d'une part de laisser de la place pour le scellement de colle et la prise de contact électrique sur les électrodes d'ITO $18 \times 18 \text{ mm}^2$ auxquelles les échantillons seront assemblés. D'autre part, cela permet de laisser assez de surface pour pouvoir par la suite sceller le puits de PDMS qui doit accueillir les cultures de neurones.

Le *design* présenté Figure 67(b) permet alors d'avoir, à l'issue de toutes les étapes de fabrication, un maximum de 32 échantillons sur un même wafer 100mm.

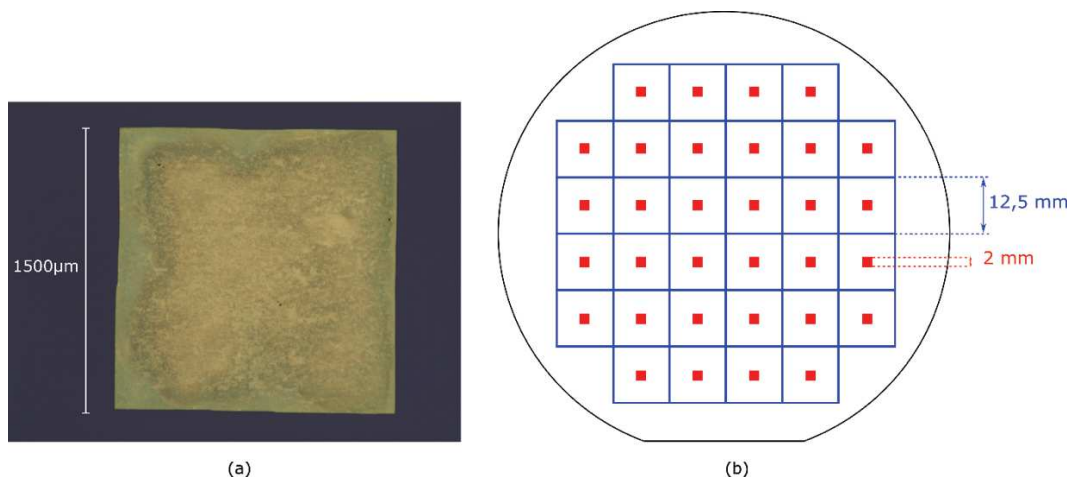


Figure 67 (a) Photo d'une membrane de SiN de 100nm d'épaisseur issue d'une ouverture initiale de $2 \times 2 \text{ mm}^2$ réalisée par ablation laser en face arrière (b) Design exécuté par le logiciel de la gravure laser pour la prédécoupe des échantillons dans le wafer (en bleu) et l'évidement des zones à libérer en rouge.

Les échantillons sont ensuite clivés selon le quadrillage, et prêts à être assemblés pour former le dispositif à base de cristaux liquides qui sera détaillé dans le chapitre suivant.

3. Caractérisation optique des membranes

Un des critères requis par notre cahier des charges est la transparence optique de l'ensemble du dispositif. Nous avons mené une première série de mesures pour évaluer la transparence des membranes ainsi fabriquées, ainsi que l'influence de leur épaisseur sur ces propriétés de transmission optique.

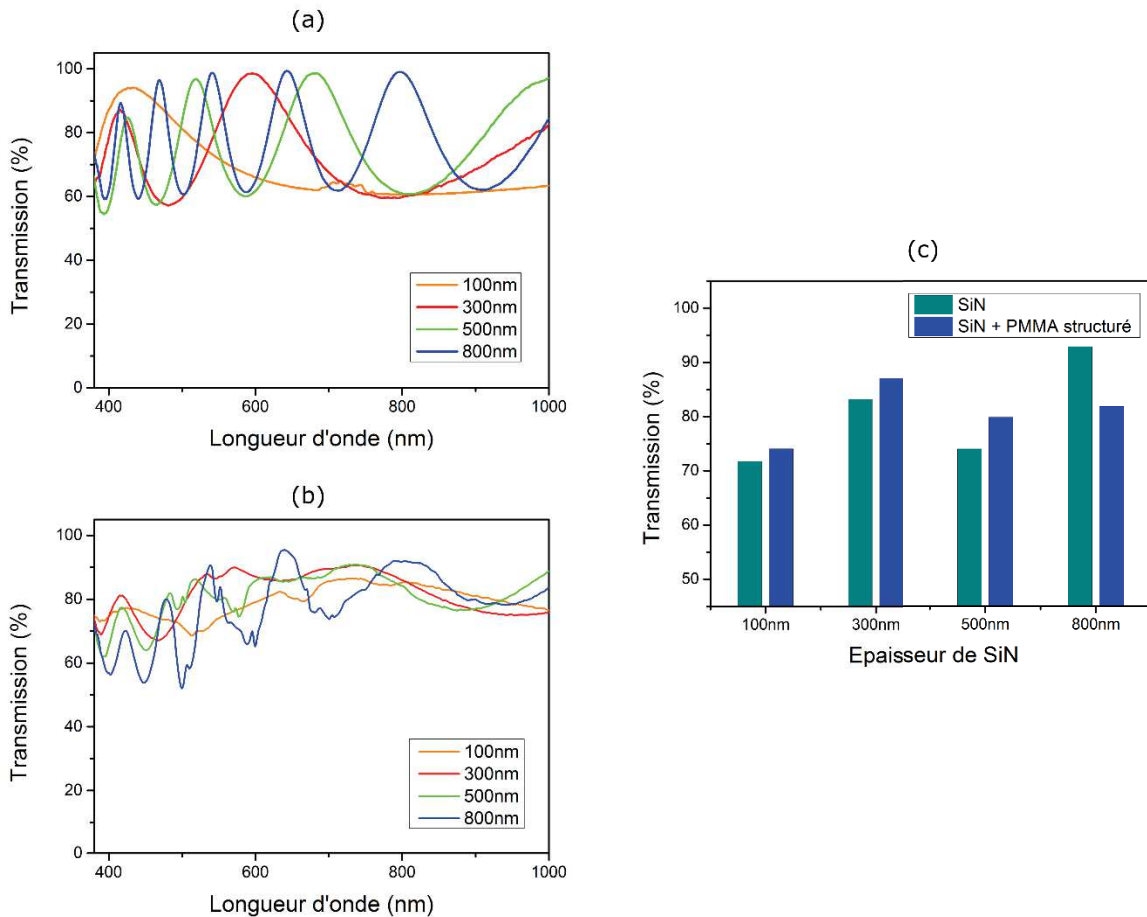


Figure 68 Transmission mesurée sur l'ensemble du spectre visible à travers les membranes de nitrure de silicium de différentes épaisseurs : (a) membranes de SiN seules (b) membranes de SiN recouvertes de PMMA structuré. (c) Transmission à la longueur d'onde de travail (550nm) pour les différentes épaisseurs de membrane de SiN avec et sans PMMA structuré.

La Figure 68 présente les spectres de transmission mesurés (par définition le rapport entre l'intensité transmise et l'intensité de la lumière incidente) pour les 4 épaisseurs de membranes dont nous disposons, à savoir 100, 300, 500 et 800nm. Ces spectres ont été obtenus grâce à un dispositif de microscopie optique développé au laboratoire [181], pour les membranes de nitrure de silicium brutes (a) et pour ces mêmes membranes recouvertes de PMMA structuré par les motifs d'alignement des cristaux liquides. (Pour rappel ces motifs sont des réseaux de lignes de 250nm de large espacées de 250nm et hautes de 170nm. L'épaisseur totale de PMMA est d'environ 180 à 200 nm.)

Nous constatons tout d'abord sur les spectres de transmission des membranes SiN brutes Figure 68 (a) que la fraction de lumière transmise est comprise entre 60 et 95% sur l'ensemble du spectre optique, quelle que soit l'épaisseur de SiN. Ce pourcentage de transmission est légèrement atténué avec l'ajout du PMMA Figure 68(b), il varie en effet entre 55 et 90% sur l'ensemble des longueurs d'ondes, toutes épaisseurs de nitrure confondues.

Nous constatons dans un deuxième temps que la transmission à travers les membranes varie avec la longueur d'onde. Pour les membranes brutes (a), des pics de transmission apparaissent à certaines longueurs d'ondes et se multiplient quand l'épaisseur de la membrane augmente. Ces interférences sont dues aux réflexions successives de la lumière aux interfaces SiN/air, l'indice optique du SiN étant supérieur à celui de l'air ($1,98 < n_{\text{SiN}} < 2,016$ sur l'ensemble de la gamme visible). Cette configuration agit en effet tel un résonateur de Fabry-Perot.

Les spectres de transmission pour les membranes SiN recouvertes de PMMA structuré sont plus compliqués à interpréter. Néanmoins nous pouvons attribuer l'allure de ces spectres à deux phénomènes qui se superposent et interfèrent avec le précédent :

- D'une part les interférences créées par les réflexions multiples de la lumière aux interfaces avec l'ajout d'un troisième matériau d'indice optique différent ($n_{\text{PMMA}} = 1,49$).
- D'autre part les diffractions causées par la structure en réseau du PMMA.

Ces phénomènes sont plus au moins importants selon l'épaisseur de SiN. Par exemple pour une membrane de 100nm de nitrure de silicium recouverte de ~200nm de PMMA, les phénomènes optiques liés au PMMA semblent être prépondérants. A l'inverse pour une membrane de 800nm de nitrure recouvert de PMMA, ce sont les interférences de types Fabry-Perrot qui sont dominantes.

Pour la longueur d'onde à laquelle nous allons travailler par la suite, à savoir 550nm, la transmission à travers les membranes brutes et structurées est donnée en Figure 68 (c) pour les différentes épaisseurs. L'intensité de lumière transmises varie peu selon l'épaisseur de la membrane : elle est de 75% au minimum pour une membrane de 100nm recouverte de PMMA, et 85% pour une membrane de 300nm recouverte de PMMA.

Finalement la transmission optique à travers les membranes est relativement élevée et conforme à nos critères quelle que soit l'épaisseur de nitrure de silicium.

Conclusion de la partie III

Le nitrure de silicium a été évalué et choisi comme matériau diélectrique pour former l'interface neurones/cristaux liquides homogène. Dans un premier temps, une stratégie impliquant des procédés de gravure conventionnels a été adoptée pour fabriquer cette interface sous forme de membrane mince, plane et autosupportée. Dans un deuxième temps, ce procédé de fabrication de membrane mince de nitrure de silicium a été optimisé grâce à l'utilisation de l'outil d'ablation laser. Cette séquence technologique novatrice présente de nombreux avantages pour notre application :

- **Tout d'abord, c'est grâce à cet outil, que nous avons pu découper, dans les grands wafers 200 mm, les deux wafers 100mm adoptés par la suite et qui ouvrent la voie à la fabrication collective d'échantillons avec l'infrastructure technologique disponible (standard 100mm).**
- **L'usinage en face arrière a été simplifié de deux façons : D'une part le déplacement du laser directement contrôlé par le dessin rentré dans le logiciel de commande permet de s'affranchir de l'étape de masquage. D'autre part, l'évidement est considérablement plus rapide comparé à une ouverture classique en gravure humide (~14h) : il faut en effet compter 20 minutes pour l'ouverture par ablation laser combinées aux 2 heures en moyenne de gravure KOH.**
- **En phase finale, la découpe en échantillons unitaires est effectuée sans risques d'endommager les membranes contrairement à une méthode plus classique de découpe à la scie diamantée. Elle est également très précise et contrôlée par rapport au caractère parfois aléatoire du clivage simple. En effet le laser fait une pré-découpe selon un grillage bien défini et aligné, le clivage permet ensuite une découpe conforme à ce quadrillage.**

Une caractérisation morphologique de l'ouverture dans le silicium des fenêtres menant à la libération des membranes de nitrure par la technique de l'ablation laser a été réalisée, nous permettant d'extraire des règles simples pour la conception géométrique des membranes.

Pour finir, des mesures optiques ont été menées sur les membranes de nitrures brutes d'une part et sur ces mêmes membranes recouvertes de PMMA d'autres part, révélant une transmission optique comprise entre 70 et 90% à 550nm selon l'épaisseur de nitrure choisie, et la présence ou non de PMMA.

Conclusion du Chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons rapporté l'exploration de plusieurs technologies pour la fabrication d'un élément clé du dispositif : la couche séparant les neurones des cristaux liquides. Cette interface devait répondre aux principaux critères morphologiques et fonctionnels suivants :

- Transmettre localement et « verticalement » les signaux électriques des neurones vers la couche sous-jacente de cristaux liquides.
- Être suffisamment transparente optiquement de manière à récolter les variations d'intensité optique sur le capteur imageur sans atténuation majeure.
- Assurer l'alignement des molécules de cristaux liquides : elle doit être suffisamment rigide et plane pour permettre de disposer d'une épaisseur uniforme et homogène de cristaux liquides et de garantir leur alignement.

➤ Interface composite

La première approche adoptée consistait à élaborer un matériau composé d'un ensemble d'éléments conducteurs répartis dans une matrice d'un matériau isolant. Un large panel de technologies a été exploré avec comme élément conducteur soit du PEDOT, soit des nanofils de silicium. Différentes approches ont été sondées pour d'une part associer cet élément conducteur avec une matrice isolante, d'autre part structurer la couche composite ainsi formée avec les motifs d'alignement des cristaux liquides, et enfin la libérer d'un éventuel substrat et/ou pouvoir la manipuler afin de l'assembler au reste des éléments du dispositif. Après avoir évalué la complexité et le temps de mise en œuvre de chacune d'elle, nous avons finalement conclu qu'aucune de ces approches n'était convenable pour un développement abouti à l'échelle d'un projet de thèse, et encore moins pour une intégration future dans un produit industriel, mêmes si certaines se sont avérées plus prometteuses que d'autres et mériteraient éventuellement d'y consacrer plus de temps.

L'interface a finalement été fabriquée avec succès dans un matériau diélectrique uniforme, conformément à la deuxième approche.

➤ Interface uniforme

Une membrane mince de nitrure de silicium plane et autosupportée a en effet été fabriquée dans un premier temps grâce à des procédés de gravure conventionnels. Dans un deuxième temps nous avons développé un procédé de fabrication basé sur une technique d'ablation laser qui permet de paralléliser la production d'échantillons, avec une bonne reproductibilité et un temps de fabrication réduit par rapport à des procédés existants.

Les membranes de SiN fabriquées répondent d'une part aux contraintes morphologiques initialement définies : nous obtenons une membrane bien plane et structurée en face avant pour l'alignement des cristaux liquide. D'autre part nous avons montré qu'à la longueur d'onde de travail (550nm) les membranes structurées transmettent 75 à 85% de la lumière incidente.

Nous allons maintenant nous intéresser à l'intégration de ces membranes au reste de la cellule à cristaux liquides pour étudier l'ensemble du dispositif électro-optique ainsi formé ainsi que sa capacité à traduire les champs électriques en signaux optique.

Chapitre 4

Assemblage et caractérisations du dispositif

Dans le chapitre précédent nous avons décrit la méthodologie adoptée pour la synthèse de la pièce maitresse de notre dispositif, à savoir, l'interface entre les neurones et les cristaux liquides. La solution retenue est une membrane mince autosupportée de nitrure de silicium structurée, sur l'une de ses faces, avec les motifs nécessaires pour l'alignement des cristaux liquides.

Dans ce chapitre, nous allons, dans un premier temps, voir comment le dispositif final est construit autour de cette pièce maitresse en décrivant tous les autres composants le constituant ainsi que les différents protocoles d'assemblage mis en œuvre. Nous allons décrire ensuite le banc de caractérisation qui a été utilisé suivi des caractérisations optiques et électro-optiques fonctionnelles menées pour évaluer l'aptitude de ce dispositif à retranscrire les signaux électriques en variations d'intensité optique. Dans un second temps, nous avons cherché à obtenir la preuve du concept de la capacité de notre transducteur à détecter un signal électrique localisé de type activité neuronale. N'ayant pas forcément, à ce stade de l'étude, résolu tous les aléas relatifs aux cultures neuronales, nous nous sommes contentés d'évaluer la capacité du dispositif final à détecter une variation locale de champ électrique de faible intensité. Pour cela nous avons mis au point un outil de caractérisation microfluidique capable de mimer l'activité électrique d'un neurone et chercher à déterminer les caractéristiques de détection de notre dispositif. Enfin, une campagne d'interface du dispositif avec les neurones biologiques, visant à estimer la compatibilité biologique et la viabilité de ces neurones dans les dispositifs développés a été entamée en premier lieu au sein du laboratoire, puis en collaboration avec l'institut des Neurosciences de Grenoble.

I. Étude du dispositif final

Dans cette partie nous verrons dans un premier temps comment nous avons repris les étapes technologiques mises au point au chapitre 2 pour l'assemblage du dispositif final, en incluant l'interface neurone/cristaux liquides fabriquée au chapitre 3. Le banc de caractérisation développé au niveau du laboratoire sera présenté, suivi des principales caractérisations optiques pour évaluer la transparence du dispositif, puis électro-optiques pour évaluer sa capacité à traduire un champ électrique en variation d'intensité optique.

A. Fabrication : assemblage des différents éléments

Le dispositif final est issu de l'assemblage de plusieurs constituants élémentaires selon un protocole expérimental dont les principales étapes technologiques sont schématisées Figure 69 ci-dessous :

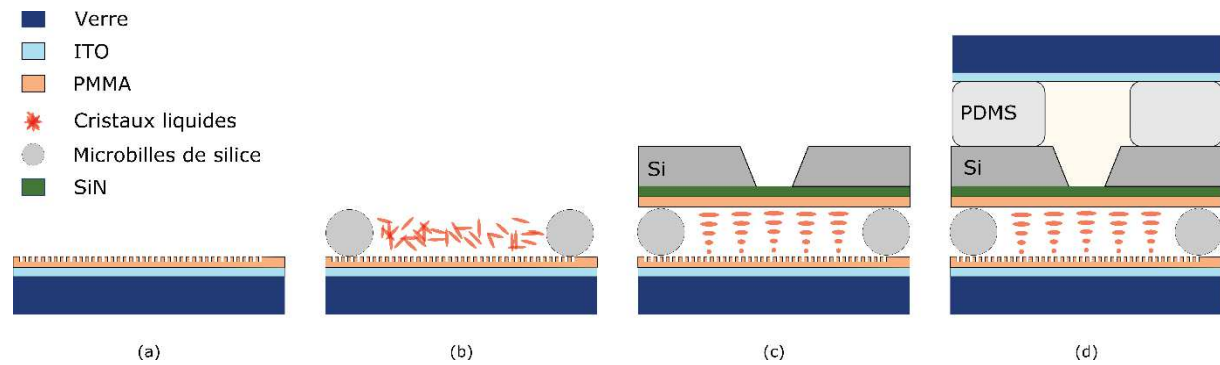


Figure 69 Étapes de fabrication du dispositif final : (a) Structuration de l'électrode inférieure de verre-ITO avec les motifs d'alignement en PMMA. (b) Dépôt d'espaceurs : microbilles de silice et dispense des cristaux liquides. (c) Pose de l'interface neurones- cristaux liquides. (d) Pose du réservoir en PMDS contenant le milieu de culture des neurones, et clôture avec l'électrode supérieure.

Dans les paragraphes suivants, nous allons passer en revue ces différentes étapes et en préciser les détails techniques pertinents.

➤ **Électrode inférieure :**

L'électrode inférieure consiste en un substrat de verre carré de 18mm de côté et de 1,1mm d'épaisseur surmonté d'une couche mince de 100nm d'ITO fournie par Visiontek Systems. Ce substrat devant être couvert sur sa face supérieure avec des motifs d'alignement des cristaux liquides, nous commençons par lui appliquer un nettoyage aux solvants (un bain d'acétone pendant 15 min aux ultrasons à 35°C suivi par un rinçage à l'isopropanol et un séchage à l'azote). Ce nettoyage s'est avéré primordial pour garantir une bonne adhérence des motifs d'alignement et une reproductibilité du procédé de nanoimpression retenu : un promoteur d'adhérence VM652 est tout d'abord appliqué par spincoating (à 4000rpm pendant 60 secondes), puis 150nm de PMMA 950K A2 sont déposés par spincoating (à 1500 rpm pendant 30s, suivi d'un softbake à 90°C pendant 1min). Enfin, les motifs d'alignement (canaux de 250nm de large, espacés de 250nm) sont obtenus par nanoimpression thermique (voir détails dans partie III.A du chapitre 2) grâce à un moule flexible en IPS de 170nm de profondeur.

➤ **Espaceurs et cristaux liquides :**

Les espaceurs, servant à maintenir une épaisseur uniforme et bien définie de la couche de cristaux liquides, sont ensuite déposés à partir d'une solution de microbilles de silice diluées dans l'éthanol. Cette dilution a été choisie car l'éthanol est inerte vis-à-vis des lignes du PMMA préalablement imprimées. Deux types de solutions, monodisperses, contenant des microbilles de silice de 2µm ou 4,5µm, selon le type de cristaux liquides (2µm pour E7 et 4,5µm pour PCH5) ont été utilisés pendant ce travail de thèse. Le dépôt se fait par spincoating ce qui permet de répartir uniformément les billes à la surface du substrat, l'éthanol s'évaporant ensuite, à température ambiante, sans endommager le PMMA. Plus de détails sur les dilutions, l'étalement et le taux de recouvrement du substrat par cette technique sont donnés à la section III.B du chapitre 2.

Enfin, la dispense des cristaux liquides est opérée en déposant, à l'aide d'une pipette, une goutte de quelques µL de cristaux liquides, suffisant à remplir le volume de la cellule. Cette technique de remplissage est à privilégier ici par rapport à un remplissage par capillarité sous vide qui risquerait d'endommager la membrane. Le volume de cristaux liquide déposé doit

être suffisant pour couvrir la zone de la membrane mais il n'est pas indispensable de remplir entièrement toute la cellule.

➤ **Interface neurones/cristaux liquides et scellement :**

L'interface neurones/cristaux liquides élaborée selon la séquence technologique mise au point au chapitre 3 est ensuite pressée sur le substrat. Nous rappelons que ces interfaces se présentaient sous la forme de carrés individuels de silicium de 725 μm d'épaisseur et de 12,5mm de côté portant sur leur face supérieure les mêmes motifs d'alignement que ceux élaborés sur l'électrode inférieure. Lors de l'assemblage, cette pièce est posée telle que la cavité sous membrane est orientée vers le haut et les motifs d'alignements en PMMA imprimés sur la membrane de SiN se positionnent perpendiculairement à ceux de l'électrode inférieure. Cela est nécessaire pour permettre aux cristaux liquides de s'orienter spontanément pour atteindre la structure hélicoïdale désirée. Le dispositif issu de ces trois étapes est alors maintenu à l'aide d'une pince de serrage serre-joint et un cordon d'époxy est manuellement déposé tout autour afin de sceller hermétiquement la cellule à cristaux liquides ainsi formée.

➤ **Réservoir microfluidique :**

Enfin, un réservoir microfluidique destiné à recevoir ultérieurement les cultures de neurones est déposé sur le dessus de la cellule. Nous avons opté pour le poly-diméthylsiloxane (PDMS) comme matériau et pour des formes cylindriques simples de 5mm de diamètre et 5 mm d'épaisseur. Le PDMS a été choisi en raison de sa facilité de mise en forme et de sa biocompatibilité, qui permet les échanges gazeux entre le liquide qu'il contient et le milieu extérieur, propriété primordiale pour les cultures cellulaires à venir où des paramètres comme le taux d'oxygène ou de CO_2 sont essentiels (nous y reviendrons dans la section 0 de ce chapitre). Dans cette étude, le milieu de culture est une solution ionique conductrice (*Neurobasal* fourni par la société ThermoFischer). Nous verrons que ce réservoir microfluidique peut prendre une géométrie plus complexe, comme ce sera le cas pour la caractérisation fonctionnelle du dispositif par l'approche fluidique que nous avons choisie d'explorer. (Voir section II)

Le PDMS vendu en kit (Sylgard 184 de la société Dow Corning) est préparé en mélangeant un monomère avec un agent réticulant dans un ratio massique de 10 :1. Une fois que le mélange est bien homogénéisé, une étape de dégazage est nécessaire pour évacuer les bulles d'air emprisonnées lors du mélange. Après dégazage total, le mélange est versé dans une boîte de pétri de 100mm de diamètre et 5mm d'épaisseur. L'ensemble est ensuite placé dans une étuve portée à 80°C pendant 2h afin de thermo-réticuler le PDMS. A la suite de cette étape de recuit, des carrés de 10mm de côté sont découpés, et un puits cylindrique est formé en leur centre par évidement à l'aide d'un emporte-pièce cylindrique.

➤ **Electrode supérieure :**

Après avoir éventuellement rempli ce réservoir microfluidique avec la solution biologique ad hoc, la partie supérieure du réservoir est finalement encapsulée avec une deuxième électrode de verre recouverte d'ITO (18mm*18mm), qui permettra d'appliquer le champ électrique à

l'ensemble du dispositif. Le PDMS fraîchement préparé garantit la bonne étanchéité de la structure que ce soit au niveau du silicium vers le bas ou l'ITO de l'électrode supérieure.

Une vue en coupe (non à l'échelle) et une photo du dispositif final fabriqué selon les étapes décrites précédemment sont donnés Figure 70

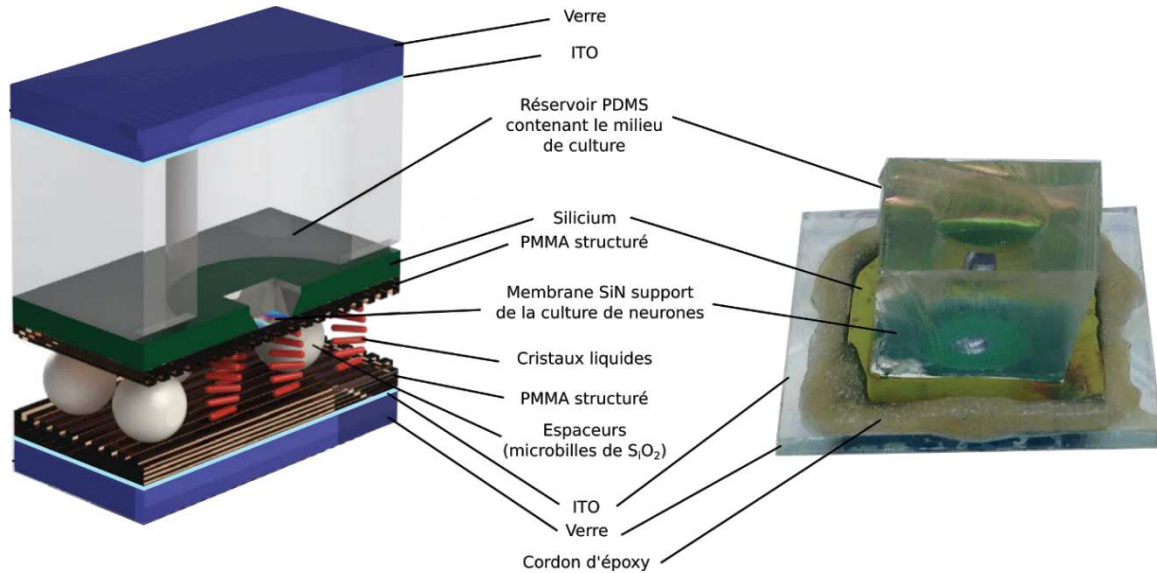


Figure 70 Illustration de la structure complète du dispositif final. A gauche : vue en coupe d'une représentation schématisée 3D du dispositif (non à l'échelle). A droite: photo d'un dispositif final (sans l'électrode supérieure en verre-ITO pour une meilleure visibilité). Dimensions de l'électrode inférieure : 18x18mm².

B. Banc de caractérisation

Un montage a été mis au point avec les équipements disponibles au laboratoire. L'objectif de ce banc expérimental est de caractériser les dispositifs fabriqués d'un point de vue de leur transmission optique d'une part, et de leur comportement électro-optique d'autre part.

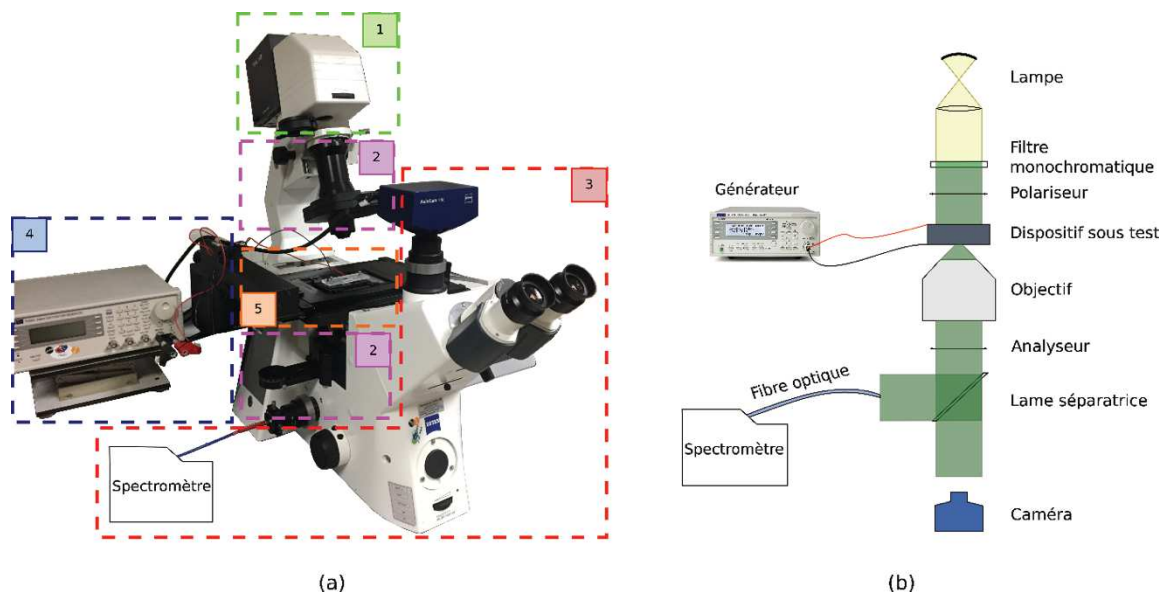


Figure 71 Montage expérimental pour les caractérisations du dispositif. (a) Photo du montage utilisé avec les différents modules le constituant : (1) Module d'éclairage. (2) Polariseurs. (3) Module de détection. (4) Module électrique. (5) Dispositif sous test. (b) Schéma optique équivalent.

Le support de ce montage, comme on peut le voir sur la Figure 71 est un microscope optique inversé Axio Observer Z1m (Zeiss), sur lequel s'articulent les éléments et caractéristiques suivants :

1. **L'éclairage.** Il est assuré par une source halogène au tungstène compacte LS-1 (OceanOptics) dont la puissance est de 100W. Cette source de lumière blanche sera utilisée pour les caractérisations de transmission optique des échantillons sur l'ensemble du spectre visible. Un support est disponible en sortie de la lampe pour rajouter un filtre monochromatique à 550 nm qui sera la longueur d'onde utilisée pour les caractérisations électro-optiques des dispositifs.
2. **La polarisation.** La lumière incidente est polarisée linéairement grâce à un polariseur placé en sortie de la lampe. L'état de polarisation de la lumière modifié après traversée du dispositif à cristaux liquides est analysé par un deuxième polariseur linéaire, l'analyseur, placé en sortie de l'objectif. Ces polariseurs (Techspec, polariseur linéaires plastiques, Edmund Optics) sont placés sur des supports rotatifs permettant de contrôler leur direction de polarisation relative (parallèle 0° ou perpendiculaire 90°).
3. **Module de détection.** Une fois que le signal optique a traversé le dispositif sous test et l'objectif (x5), la lumière peut être collectée par deux modules de détection différents. Soit un spectromètre USB QE65000 (OceanOptics) qui sera utilisé pour les caractérisations optiques des dispositifs, soit une caméra CCD Axiocam HRc (Zeiss) qui sera utilisée pour les caractérisations électro-optiques.
4. **Module électrique.** Pour les caractérisations électro-optiques, les électrodes du dispositif sont reliées à un générateur TG2000 (TTi). Nous utiliserons un signal alternatif carré sur une gamme de fréquence de 10Hz à 10MHz.
5. **Le dispositif sous test.** Afin d'uniformiser les mesures et d'optimiser la connectique entre les dispositifs expérimentaux et le module électrique, le dispositif est placé dans un porte échantillon adapté à la platine motorisée du microscope. Ce dernier a été conçu avec le logiciel SolidWorks puis fabriqué grâce à une imprimante 3D Form2 (Formlabs) en utilisant la résine Clear FLGPCL02 (Formlabs). Comme illustré sur la Figure 72, on place le dispositif dans la partie basse du support, et un contact électrique est pris sur l'électrode inférieure grâce à une bandelette de contact en cuivre. L'électrode supérieure est placée indépendamment dans la partie haute du support et le contact électrique est pris de façon similaire. Le réservoir de PDMS du dispositif est rempli du milieu de culture en formant un ménisque, puis les deux parties sont refermées précautionneusement de façon à ne pas créer de bulles, en suivant des piliers d'alignement, et vissées pour maintenir l'ensemble à pression constante.

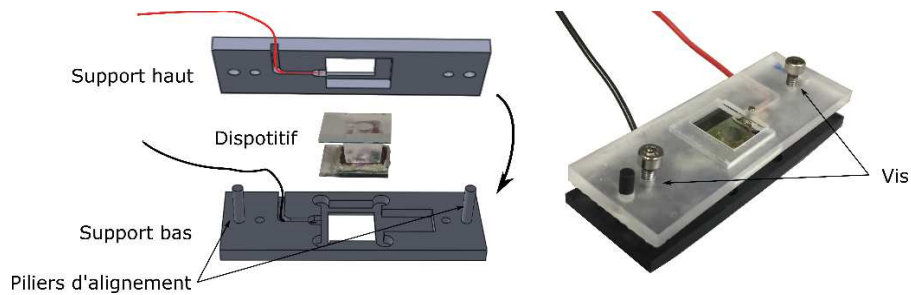


Figure 72 Configuration du dispositif sous test : le dispositif final décrit précédemment est placé dans son porte-échantillon permettant la prise de contacts électriques. Le porte-échantillon a la dimension d'une lame de microscope soit 26mmx76mm, permettant de la placer sur la platine du microscope.

Ce montage expérimental permet à ce stade de développement du dispositif des caractérisations optiques et électro-optiques du prototype développé à l'échelle du laboratoire. A terme, ce prototype devra être implémenté par les modules d'éclairage et de détection, en intégrant notamment le capteur CMOS conformément au dispositif complet imaginé. L'utilisation de l'imagerie sans lentille n'est pas nécessaire à ce stade qui n'inclut pas encore les neurones biologiques, mais a été développée en parallèle.

C. Caractérisations optiques

Selon le principe même de notre transducteur, deux grandeurs optiques sont cruciales pour garantir son bon fonctionnement. Tout d'abord, et en l'absence de toute polarisation, l'intensité de la lumière transmise le long de l'axe vertical du dispositif ne doit pas subir une atténuation excessive afin de garantir l'arrivée d'un nombre suffisant de photons sur les pixels de la camera. A ce titre la transmission optique de chaque élément du dispositif doit être examinée. Ensuite, la fonction même de la couche de cristaux liquide, à savoir sa capacité au repos (sans champ électrique appliqué) à changer la direction de polarisation de la lumière doit être évaluée à l'aide de polariseurs.

Nous présentons dans les deux paragraphes suivants les principales investigations expérimentales menées pendant ce travail de thèse afin d'évaluer ces deux caractéristiques optiques des dispositifs développés.

1. Transparence optique du dispositif

Nous avons évalué le comportement optique du dispositif final après assemblage ainsi que celui des différents éléments le constituant individuellement. Les mesures ont été réalisées sur le banc de microspectroscopie optique présenté précédemment Figure 71, selon la configuration spécifique schématisée Figure 73 (a). Pour des raisons de commodité, toutes ces mesures ont été effectuées sans les neurones biologiques. Par contre, lorsque le réservoir microfluidique faisait partie de la structure investiguée, il a été systématiquement rempli avec le milieu de culture pour se placer dans les conditions les plus proches des conditions réelles d'opération.

Les différents éléments à analyser sont placés sur la platine du microscope. La lumière est ensuite collectée sur une zone de 100 μ m de diamètre avec un objectif x5 et une fibre optique de 400 μ m de diamètre, couplée avec le spectromètre. Plus de détails sur la configuration de détection avec le spectromètre peuvent être trouvés ref [181].

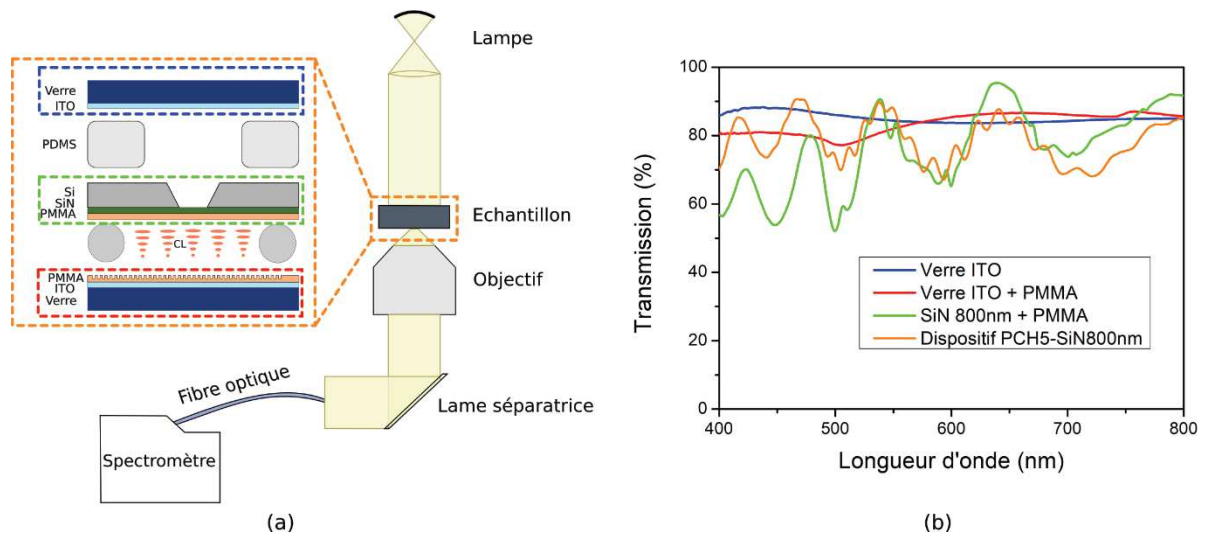


Figure 73 Transmission optique à travers les éléments constituant le dispositif. (a) Configuration optique utilisée pour les mesures. (b) Transmission des éléments individuels (l'électrode supérieure verre-ITO en bleu, l'électrode inférieure verre-ITO-PMMA en rouge et la membrane de nitrure de silicium-PMMA en vert) et du dispositif complet constitué d'une membrane de 800nm de SiN et des cristaux liquides PCH5 en orange.

Nous avons tout d'abord vérifié le comportement optique des électrodes du dispositif. Les lames de verre recouvertes d'une couche mince de 100nm d'ITO transmettent 85 à 90% de la lumière incidente sur l'ensemble de la gamme du visible (Figure 73 (b) courbe bleue). L'ajout de la couche de PMMA structurée par les motifs d'alignement sur l'électrode inférieure semble atténuer légèrement la transmission, elle n'est plus que de 80% pour la plage de longueur d'onde de 400 à 550nm, cependant elle reste inchangée au-delà de 550nm. Le spectre de transmission de la membrane de nitrure de silicium recouverte de PMMA structuré est redonné ici, pour une membrane de 800nm d'épaisseur (Figure 73 (b) courbe verte). Nous avons vu à la section II.E.3 du chapitre 3 que l'allure de ce spectre pouvait s'expliquer par les interférences dues aux réflexions successives de la lumière aux interfaces nitrure/air essentiellement. Pour cette épaisseur de nitrure, l'effet optique causé par le réseau des motifs du PMMA n'est pratiquement pas observable.

Enfin la transmission optique à travers l'ensemble du dispositif constitué des trois éléments précédents, auxquels se rajoutent les cristaux liquides (PCH5) et le réservoir de PDMS rempli du milieu de culture est donnée Figure 73 (b) courbe orange. Notons dans un premier temps que la fraction de lumière transmise à travers l'ensemble du dispositif est comprise entre 70 et 90 % sur l'ensemble du spectre visible. Dans un deuxième temps, nous observons que la transmission varie avec la longueur d'onde, de façon similaire aux variations observées à travers la membrane isolée de nitrure de silicium structurée.

D'autres interférences de plus faibles amplitudes se superposent aux précédentes sur cette même courbe et sont quant à elles attribuées aux réflexions multiples à l'interface de la couche de cristaux liquides, dont l'épaisseur est uniforme et égale à $4,5\mu\text{m}$ et l'indice de réfraction extraordinaire est supérieur à celui de l'air (pour les cristaux liquides PCH5 utilisés ici $1,47 < n_{e(\text{PCH5})} < 1,59$ pour $700\text{nm} > \lambda > 400\text{nm}$ [182]).

Finalement, le dispositif complet transmet en moyenne 80% de la lumière incidente sur l'ensemble de la gamme visible.

2. Efficacité optique du dispositif

Nous nous intéressons maintenant au comportement optique du dispositif en présence des polariseurs afin d'évaluer la fonction même de la couche structurée de cristaux liquides. A partir du montage optique précédent, on rajoute des polariseurs de part et d'autre de l'échantillon, le premier en sortie de la lampe, le deuxième en sortie de l'objectif.

Nous avons choisi des polariseurs à fort contraste de chez Edmund Optics dont les caractéristiques de transmission sont présentées Figure 74 [183]. Un polariseur seul transmet environ 40% de la lumière incidente (courbe bleue, *single*). Si l'analyseur a sa direction de polarisation parallèle à celle du polariseur alors l'intensité de la lumière transmise sera maximale et d'environ 35 à 40% (courbe rose). A l'inverse s'ils sont perpendiculaires entre eux, alors toute la lumière sera absorbée et l'intensité transmise sera minimale, voire nulle (courbe verte, *crossed polariser*).

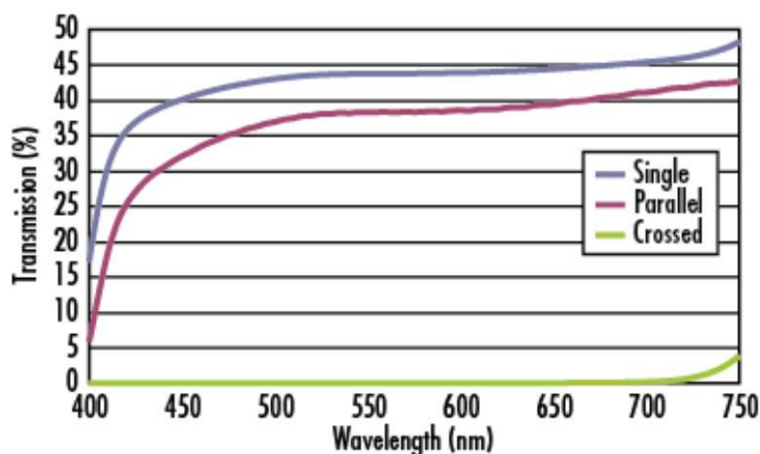


Figure 74 Caractéristiques de transmission des polariseurs utilisés. Données du fournisseur Edmund Optics [183].

Les caractéristiques de transmission de notre dispositif pour les deux états de polarisations (parallèle et croisée), sont présentés Figure 75.

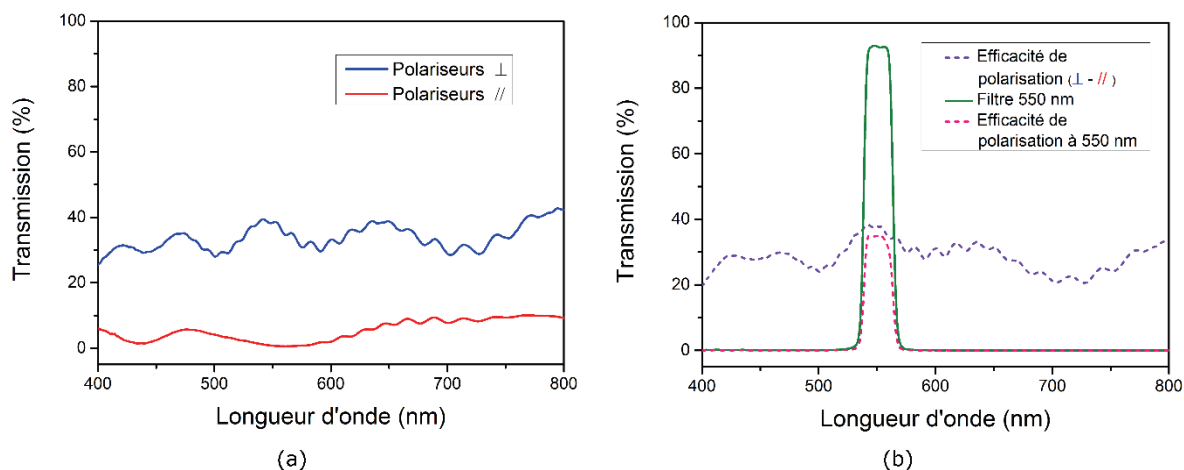


Figure 75 Caractéristiques de transmission à travers le dispositif (cristaux liquides PCH5, membrane SiN de 800nm) en présence des polariseurs. (a) Spectres bruts pour les deux états de polarisations. (b) Efficacité de polarisation du dispositif sur l'ensemble du spectre visible (courbe pointillée violette) obtenue par soustraction des deux états de polarisation en (a), et à 550nm (courbe pointillée rose) obtenue par convolution de cette dernière courbe avec le spectre du filtre à 550 nm (courbe verte).

La Figure 75 (a) donne les spectres bruts de transmission à travers le dispositif pour les deux configurations possibles des polariseurs.

Lorsque les polariseurs sont placés parallèlement entre eux, nous notons une forte atténuation de la transmission sur l'ensemble du spectre, elle est totale autour de 550nm. A l'inverse lorsque les polariseurs sont en position perpendiculaire, on retrouve l'allure du spectre de transmission à travers le dispositif seul (Figure 73 (b) courbe orange), diminué en intensité. On retrouve ici l'atténuation induite par les polariseurs.

Nous retrouvons donc bien ici l'effet désiré de la structure en hélice de la couche de cristaux liquides : la lumière incidente polarisée linéairement par le premier polariseur suit la texture tordue à 90° des cristaux liquides en traversant le dispositif et en ressort donc avec une polarisation tournée de 90°. L'analyseur en sortie traduit cette variation de polarisation en transmission optique : s'il est parallèle au premier polariseur, il est alors perpendiculaire à la lumière en sortie du dispositif et bloque ainsi sa transmission (*Dark off state* ou configuration *Normally black*). A l'inverse si l'analyseur est perpendiculaire au premier, sa direction de polarisation est alors parallèle avec celle de la lumière sortant du dispositif, la lumière est par conséquent transmise (*Bright off state* ou *normally white*). Le contraste de transmission entre ces deux états (polariseurs parallèles et polariseurs perpendiculaires) est extrait de ces données brutes et présenté sur la courbe violette pointillée de la Figure 75 (b) qui résulte de la différence des deux modes. Comme attendu il est maximal à 550nm. C'est à cette longueur d'onde que nous travaillerons par la suite, grâce à un filtre optique placé en sortie de la lampe halogène et dont le profil de transmission est donné sur le même graphe courbe verte. La convolution de l'efficacité de polarisation du dispositif par ce profil passe bande centrée à 550nm donne la courbe pointillée rose qui révèle un contraste maximum de transmission de la lumière de 30%. Il reste compris entre 20 et 35% sur le reste de la gamme visible. La Figure 76 montre la transmission optique à travers un dispositif à cristal liquide PCH5 et membrane nitrure de silicium de 800nm, en présence du filtre à 550nm.

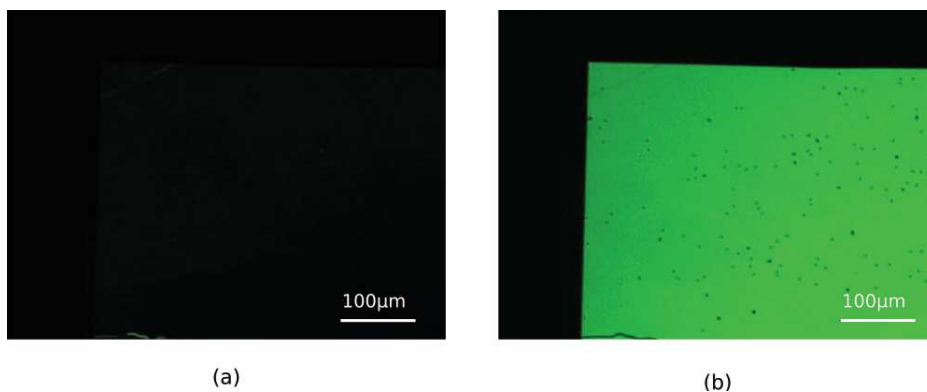


Figure 76 Apparence optique en transmission d'un dispositif formé d'une membrane en nitrure de silicium de 800nm d'épaisseur et du cristal liquide PCH5 à 550nm. Le dispositif est placé entre deux polariseurs (a) parallèles, (b) perpendiculaires. Les images ont été prises dans la configuration expérimentale décrite en amont avec la caméra CCD intégrée au microscope. La zone visible correspond à un coin de l'ouverture de la membrane.

Ces observations permettent également de vérifier que la structure en hélice tordue à 90° est correctement imposée par les couches d'alignement aux cristaux liquides et valide ces étapes de fabrications du transducteur. L'ajout de la membrane de nitrure de silicium n'altère ni l'alignement, ni la transparence par rapport à la cellule à cristal liquide « basique » fabriquée dans le chapitre 2. L'alignement est homogène sur la surface de la membrane, qui reste plane sans se déformer sur l'intégralité de l'ouverture. Cela valide la première étape de fabrication du dispositif complet.

La couche de cristaux liquides en hélice torsadée (twisted nematic) présente dans le dispositif se comporte ici comme un composant optique passif, qui n'absorbe pas ou peu la lumière (la majorité de l'atténuation d'intensité est lié à l'absorption des polariseurs), mais change la direction de polarisation de la lumière incidente polarisée linéairement. Les polariseurs traduisent ce changement de polarisation en variation de transmission optique. Lorsque aucun champ électrique n'est appliqué comme nous venons de le voir, le dispositif a un comportement binaire : soit la lumière est transmise, soit elle ne l'est pas. L'application d'un champ électrique permet de faire varier cette transmission entre son maximum et minimum de manière contrôlée. C'est à cette propriété électro-optique du dispositif que nous allons nous intéresser dans la section suivante.

D. Caractérisations électro-optiques fonctionnelles.

Configuration expérimentale

Sur le banc expérimental présenté précédemment, on se place dans la configuration spécifiée Figure 77. Le dispositif est placé dans son porte-échantillon sur la platine du microscope, il est éclairé par la source halogène suivie d'un filtre 550nm. L'analyseur est placé perpendiculairement au polariseur de façon à ce que la transmission soit nulle quand aucun champ électrique n'est appliqué, c'est le mode *normally black*. On ne s'intéresse plus qu'à une longueur d'onde, le spectromètre n'est alors plus nécessaire et on récupère ici les variations optiques sur la caméra.

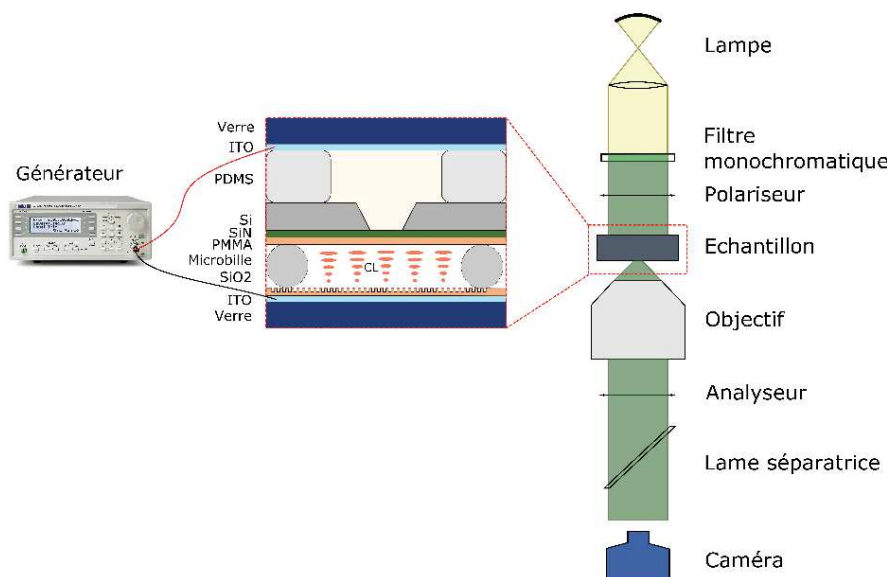


Figure 77 Configuration expérimentale adaptée aux caractérisations électro-optique du dispositif.

1. Fonctionnement électro-optique

Le comportement du dispositif complet sous champ électrique est étudié ci-après, en appliquant aux bornes des deux électrodes d'ITO une tension variable dont la valeur efficace est l'amplitude du signal alternatif carré. La fréquence prise par défaut est $F=1\text{kHz}$ et on se place dans la configuration du *normally black mode*, entre deux polariseurs parallèles. Le dispositif par défaut est composé du cristal liquide PCH5 et d'une membrane de 800nm de nitrure de silicium. Les résultats sont présentés ci-après.

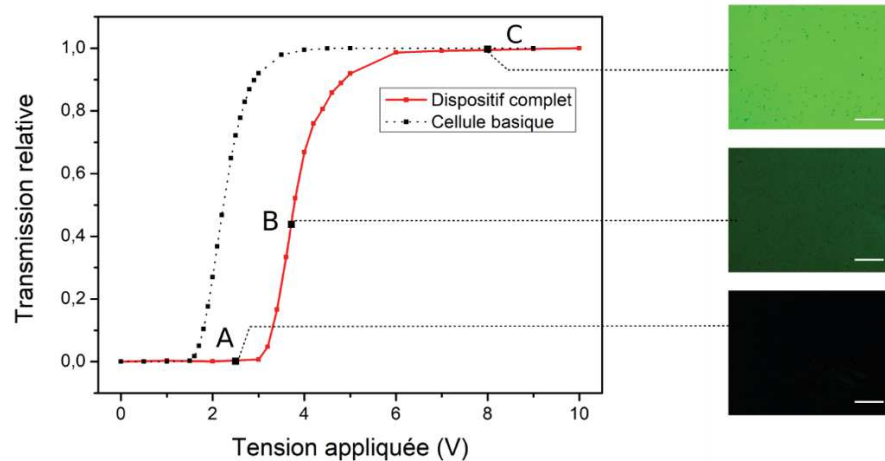


Figure 78 Comportement électro-optique du dispositif complet (rouge) fabriqué à partir du cristal liquide PCH5 et d'une membrane de SiN de 800nm, montrant l'évolution de la transmission en fonction de la tension extérieure appliquée. Les polariseurs sont parallèles. Les photos de microscopie optique en encarts montrent l'apparence en transmission du dispositif pour trois valeurs différentes de tension. Barre d'échelle 100µm. La courbe électro-optique d'une cellule à cristal liquide « basique » formée de PCH5 est donnée à titre de comparaison (noir). La fréquence est F=1KHz.

La Figure 78 montre le comportement d'un dispositif complet composé du cristal liquide PCH5 et d'une membrane de nitrure de silicium de 800nm d'épaisseur soumis à un champ électrique extérieur. On retrouve l'allure caractéristique d'une courbe électro-optique de cellule à cristaux liquides, avec une tension seuil, située ici autour de 3V, une partie linéaire et une tension de saturation à partir d'environ 6V. Lorsque le champ est nul, les molécules de cristaux liquides restent parallèles aux motifs des couches d'alignement, formant une hélice tordue à 90°. Le dispositif étant entre des polariseurs parallèles, la lumière n'est pas transmise, le dispositif apparaît noir. C'est le « black off state ». Quand la tension appliquée augmente et dépasse la valeur seuil (ici 3V) alors les molécules commencent à s'aligner avec le champ électrique, laissant passer la lumière. Au fur et à mesure que l'intensité du champ augmente, de plus en plus de molécules s'alignent avec la direction du champ, jusqu'à ce que toutes les molécules soient alignées. La lumière transmise atteint alors son maximum et l'image apparaît claire. C'est le « bright on state ». Entre les deux, la transmission optique à travers la cellule est intermédiaire et la cellule affiche un niveau de gris (dans la nuance correspondante à la longueur d'onde incidente, ici 550nm, donc vert). Cela correspond au cas de l'encart (B), pour lequel la tension appliquée a dépassé la valeur seuil, mais n'a pas atteint le palier correspondant au maximum de transmittance. Les molécules ne sont alors que partiellement alignées avec le champ électrique.

Ces premières observations confirment que notre dispositif présente bien le comportement électro-optique général visé, attribué à la couche de cristaux liquides structurée : il est capable de convertir un champ électrique en variation de transmission optique. L'ajout de la courbe électro-optique d'une cellule basique composée du même cristal liquide PCH5 (en pointillés sur la Figure 78) permet une première comparaison qualitative entre notre dispositif et la cellule à cristal liquide basique. L'allure générale de ces deux courbes est en effet similaire (tension seuil, partie linéaire et plateau de saturation). En revanche la courbe attribuée au dispositif complet est décalée vers des valeurs croissantes de tension. Concrètement cela signifie qu'un signal de plus grande amplitude doit être appliqué aux bornes des plaques d'ITO du dispositif pour franchir la valeur seuil visible par les cristaux liquides. Ce décalage en tension est attribué à l'atténuation du champ électrique après traversée du milieu de culture et de la membrane de nitrure. En effet les valeurs de tension affichées sont celle appliquées aux couches d'ITO. Dans le cas d'une cellule simple, ces valeurs correspondent directement à la tension vue par les cristaux liquides. Pour le dispositif en revanche, le champ électrique doit

traverser le milieu de culture et la membrane de nitrure de silicium. La tension vue par la couche de cristaux liquide est donc atténuée par la résistivité de ces deux éléments, augmentant la tension globale à appliquer au dispositif. Ce décalage est cependant modéré puisqu'il ne faut augmenter l'amplitude du champ électrique que de 1 à 2V. Cette observation valide le deuxième critère essentiel requis pour la couche interface : sa transparence aux champs électriques. La membrane dans la configuration finale (surplombée du milieu de culture) n'écrante pas complètement le champ électrique, elle ne l'atténue que faiblement, ce qui peut être compensé raisonnablement par une intensification modérée du champ électrique global.

De plus, la partie linéaire de la courbe électro-optique du dispositif complet est identique à celle de la cellule basique : leur pente a la même valeur, à savoir $a=0,79$. L'ajout de la membrane de nitrure de silicium surplombée du milieu de culture ne perturbe donc pas la sensibilité du transducteur. Cette caractéristique est essentielle pour la détection des signaux neuronaux comme nous l'avons vu au chapitre 2. Même si en soit la raideur électro-optique d'une cellule PCH5 est inférieure à celle théorique de E7, (0,79 vs 1,38 respectivement) et n'est a priori pas optimale pour la détection de signaux neuronaux, l'utilisation par défaut du cristal liquide PCH5 permet néanmoins d'effectuer ces premières caractérisations et d'en tirer les tendances générales. Pour ces étapes une performance optimale de la couche de cristaux liquides n'est pas forcément requise. Elles pourront être optimisées par la suite en remplaçant PCH5 par un cristal liquide adapté (comme E7 par exemple, ou autre) lorsque l'enregistrement des neurones sera envisagé.

2. Influence de la fréquence

L'influence de la fréquence du signal alternatif appliqué au dispositif a été étudiée. Les résultats sont résumés Figure 79 ci-dessous.

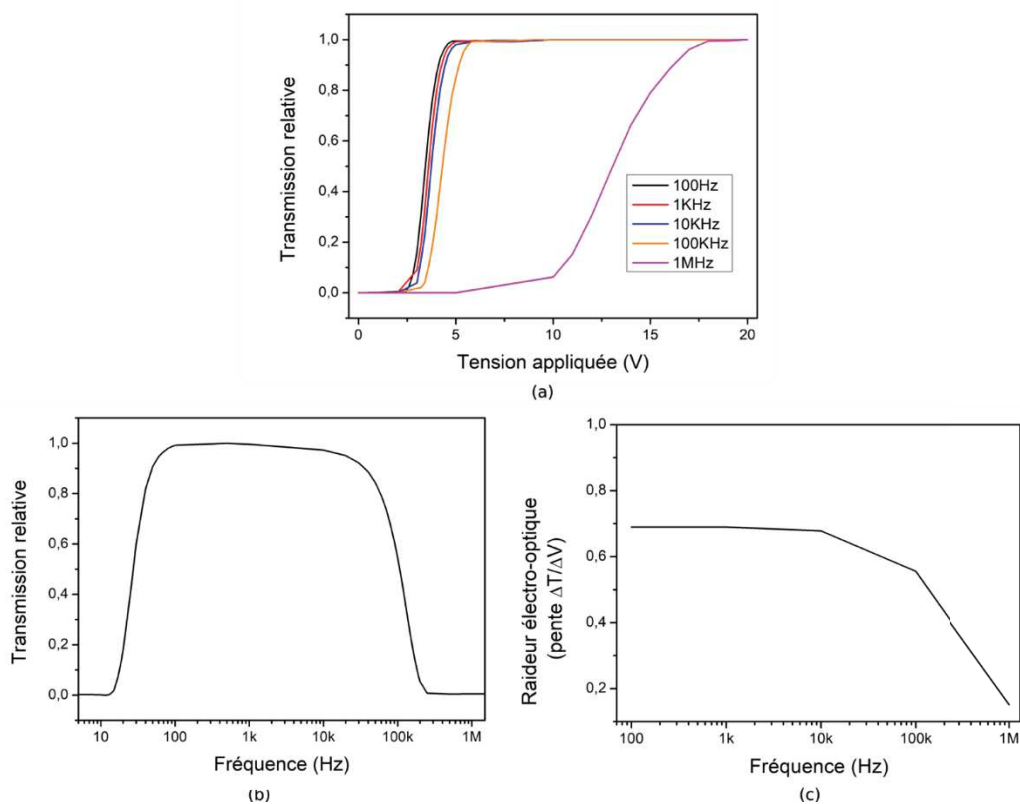


Figure 79 Influence de la fréquence du signal appliqué. Dispositif formé de PCH5 et d'une membrane de 800nm de nitrure de silicium. (a) Transmission relative en fonction de la tension appliquée pour différentes fréquences. (b) Transmission relative en fonction de la fréquence, la tension a été fixée à 4V. (c) Evolution de la raideur électro-optique (pente de la partie linéaire) en fonction de la fréquence.

La caractéristiques électro-optiques du dispositif composé du cristal liquide PCH5 et d'une membrane de nitrure de silicium de 800nm d'épaisseur ont été investiguées pour différentes fréquences du signal alternatif appliqué. La Figure 79 (a) représente la transmission relative à travers le dispositif en fonction de la tension appliquée pour des fréquences variant de 100Hz à 1MHz. En complément, on peut voir l'évolution de cette transmission en fonction de la fréquence pour une valeur de tension fixée à 4V sur la Figure 79(b). La plage de fréquence est limitée par le bas à 50Hz environ, limite de sensibilité de notre œil. (En dessous de cette fréquence, notre œil est assez rapide pour détecter les changements d'aspects et le dispositif apparaît en scintillant tel un stroboscope).

On observe tout d'abord un décalage progressif de la tension seuil avec les valeurs croissantes de fréquence. Pour les trois fréquences les plus basses (100Hz, 1KHz et 10KHz) ce décalage est très faible, les courbes ne sont décalées que de quelques mV. A 100KHz l'écart est davantage marqué, et pour la courbe à 1MHz la tension seuil passe de 3V à presque 10V. Ces observations couplées à celles de la figure (b) révèlent une plage bien définie de fréquence pour laquelle le comportement électro-optique du dispositif est constant. Ce résultat est à mettre directement en relation avec l'effet de la fréquence sur la constante diélectrique des cristaux liquide. En effet, on avait vu dans le chapitre 2 que l'anisotropie diélectrique restait constante et maximale sur une plage de fréquence comprise entre 100Hz et 10KHz pour le cristal liquide PCH5. Au-delà de ces valeurs, la composante $\epsilon_{//}$ commençait à chuter, diminuant la valeur de l'anisotropie diélectrique globale. Or, c'est cette caractéristique du cristal liquide qui définit sa capacité à changer d'orientation sous l'effet d'un champ électrique. (Plus $\Delta\epsilon$ est grand, plus le cristal liquide sera sensible au champ).

Ce phénomène est confirmé par les observations des pentes de la Figure 79 (a), dont les valeurs ont été calculées et tracées en fonction de la fréquence Figure 79 (c). La pente de la partie linéaire de la courbe électro-optique est maximale sur la plage de fréquence comprise entre 100Hz et 10KHz.

Minimiser la tension seuil peut parfois être avantageux (pour réduire la consommation d'énergie dans le cas de dispositifs industriels par exemple) mais elle n'est pas critique pour notre application. En revanche, optimiser le fonctionnement et la sensibilité du dispositif est primordial. Il faut pour cela se placer dans la plage adéquate de fréquence qui correspond à la plus grande pente électro-optique. Cette plage est centrée à 1KHz et confirme cette valeur à utiliser par la suite.

3. Influence de l'épaisseur de la membrane de SiN.

Les courbes électro-optiques de transmission en fonction de la tension appliquée ont été tracées pour différentes épaisseurs de la membrane de nitrure de silicium constituant l'interface neurones/cristaux liquides. Les résultats présentés sur la Figure 80(a) montrent les différentes courbes électro-optiques se superposant les unes aux autres. Leur tension seuil ainsi que leur raideur électro-optique ne semblent pas influencées par l'épaisseur de nitrure de silicium.

Nous avons regardé ces valeurs de plus près en traçant Figure 80(b) l'évolution de la raideur électro-optique pour chacune des 4 épaisseurs utilisées. On observe une légère variation de la pente selon l'épaisseur de SiN, mais aucune loi mathématique ne semble pouvoir être attribuée en l'état, sans plus de points disponibles. De plus, les valeurs restent globalement comprises entre 0,65 et 0,79, ce qui nous pousse à conclure que l'épaisseur de nitrure de silicium utilisée n'influence pas la raideur électro-optique du transducteur, donc sa sensibilité, en tout cas dans la plage de valeurs testées c'est-à-dire entre 100nm et 800nm. Ce résultat est conforme à ce qui avait été prédit qualitativement par le modèle des circuits électriques équivalents au chapitre 2 et nous conforte dans le choix de ce matériau comme interface neurones/cristaux liquides. Des couches de diélectrique significativement plus épaisses atténueraient plus le champ électrique, augmentant ainsi la valeur de la tension à appliquer

à l'ensemble du dispositif pour que la tension effective vue par les cristaux liquides soit suffisante, jusqu'à ce que la valeur à appliquer ne soit plus raisonnable. (Typiquement le générateur utilisé fourni des tensions jusqu'à 20V, et des valeurs trop importantes pourraient endommager les cristaux liquides).

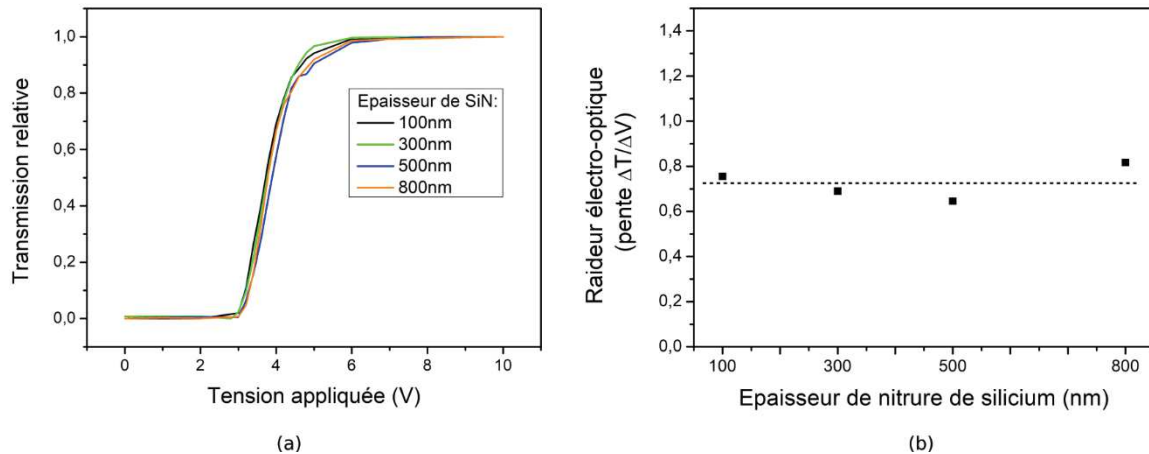


Figure 80 Influence de l'épaisseur de la membrane de nitrure de silicium utilisée comme interface neurones/cristaux liquides. Le cristal liquide est PCH5 et la fréquence est fixée à 1KHz. (a) Transmission optique relative à travers le dispositif en fonction de la tension appliquée pour différentes épaisseurs de SiN. (b) Evolution de la raideur électro-optique (pente) en fonction de l'épaisseur de SiN.

Par ailleurs, nous n'avons pas effectué d'étude mécanique poussée de ces membranes, mais les observations électro-optiques des dispositifs formés montrent que l'alignement est homogène sur toute la surface ouverte pour les différentes épaisseurs. La membrane ne se déforme pas, ou en tout cas les espaceurs parviennent à la maintenir plane, assurant une épaisseur homogène. Des casses ont cependant pu être observées lors de la fabrication des membranes ou de l'assemblage des dispositifs, et ces casses étaient plus fréquentes pour les faibles épaisseurs de SiN. D'après toutes ces observations, il apparaît plus avantageux à terme de privilégier pour l'interface neurone/cristaux liquides les membranes plus épaisses de nitrure de silicium (500nm ou 800nm par exemple), qui sont plus rigides sans pour autant perturber l'efficacité électro-optique du dispositif.

4. Influence des cristaux liquides

Un financement européen obtenu en cours de thèse, autour de ce projet entre autres, a permis d'acquérir le cristal liquide E7 qui a été étudié en détail dans la partie théorique menée au chapitre 2. Des expériences ont pu être faites pour tester les caractéristiques de ce cristal liquide intégré au dispositif. La courbe électro-optique d'un dispositif formé de E7 et d'une membrane de nitrure de silicium de 800nm d'épaisseur est donnée Figure 81. La courbe électro-optique du dispositif équivalent formé du cristal liquide PCH5 est à nouveau présentée à titre de comparaison.

La courbe électro-optique du dispositif formé du cristal liquide E7 (bleue) présente une tension seuil légèrement inférieure à celle du dispositif PCH5 (rouge) : 2,7V vs 3V environ, respectivement. De la même façon que la tension seuil du dispositif PCH5 était décalée par rapport à sa valeur théorique et à sa valeur en configuration cellule à cristal liquide basique, la tension seuil du dispositif E7 est également décalée par rapport à sa valeur théorique ($V_{th(E7)}=0,97V$). Ce décalage peut être de façon similaire attribué à l'atténuation du champ électrique traversant le milieu de culture ainsi que la membrane de nitrure de silicium.

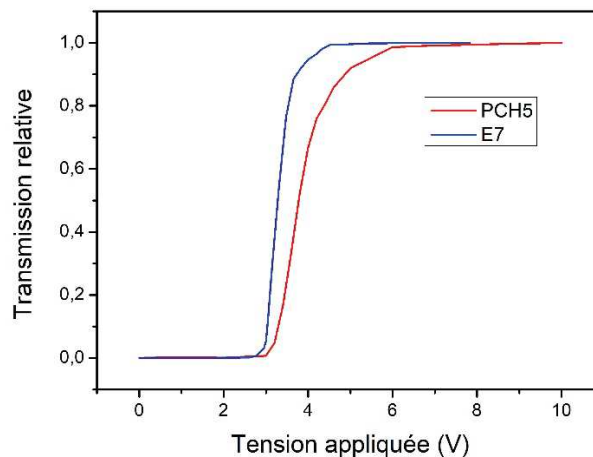


Figure 81 Comportement électro-optique du dispositif composé d'une membrane de 800nm de nitrure de silicium montrant la transmission en fonction de la tension appliquée pour les deux cristaux liquides à disposition : PCH5 en rouge et E7 en bleu.

En ce qui concerne la raideur électro-optique, celle-ci apparaît plus élevée pour E7 que pour PCH5, la pente étant plus droite. La valeur précise calculée à partir de ces observations est trouvée égale à 1,29 pour E7. Cette valeur est supérieure à celle correspondante au dispositif à cristal liquide PCH5 (0,79 dans cette configuration) et améliore significativement la sensibilité du dispositif. La pente est cependant légèrement inférieure à la valeur renseignée par le fournisseur, qui était de 1,38 (voir partie II.B.2). Cet écart est peut-être dû aux techniques de fabrication de la partie transducteur à cristaux liquides, qui diffèrent vraisemblablement de celles employées par le fournisseur (Merk) pour évaluer les caractéristiques de ses cristaux liquides. Néanmoins, cette valeur reste largement correcte pour la détection des signaux neuronaux envisagée par la suite.

Même si en soit les caractéristiques affichées par le cristal liquide PCH5 utilisé ici pour la plupart des caractérisations ne sont pas optimales pour détecter un signal neuronal, son utilisation nous a permis de mettre au point les étapes de fabrication ainsi que les premières caractérisations. Les tendances électro-optiques générales mises en évidence ici peuvent être généralisées aux cristaux liquides aux propriétés similaires (des cristaux liquides nématiques et à anisotropie diélectrique positive) comme E7, ou d'autres composés présentant de meilleures propriétés de raideur électro-optique notamment, afin d'optimiser éventuellement à l'avenir les performances du dispositif.

Conclusion de la partie I

Dans cette partie nous avons décrit la fabrication d'un prototype de transducteur à base de cristaux liquides, combinant d'une part les étapes technologiques mises au point dans le chapitre 2 relatives à la fabrication d'une cellule à cristaux liquides « basique », et d'autre part une interface neurone/cristaux liquides consistant en une membrane fine de nitrure de silicium dont la fabrication a été décrite dans le chapitre 3. L'assemblage du dispositif final est obtenu en confinant une couche de cristaux liquides d'épaisseur homogène entre un substrat de verre recouvert d'ITO et la membrane de nitrure de silicium. L'ensemble, une fois scellé, est surplombé d'un module microfluidique destiné à contenir les neurones qui seront à terme cultivés directement sur la membrane de nitrure de silicium. Une deuxième électrode de verre recouverte d'ITO permet d'appliquer un champ électrique à travers l'ensemble de ce dispositif. Les surfaces en contact avec

les cristaux liquide sont toutes les deux recouvertes d'une couche d'alignement, qui confère à la texture des cristaux liquides une structure en hélice tordue à 90°, propre au mode nématique torsadé.

Un banc de caractérisation dédié a été mis au point et a permis de mener des études optiques et électro-optiques poussées. Les caractérisations optiques ont révélé une transmission globale de 80% à travers l'ensemble du dispositif constitué d'une membrane de 800nm et du cristal liquide PCH5, considéré comme le dispositif de référence par défaut. Ces caractérisations optiques ont également permis de vérifier que la structure en hélice torsadée à 90° est correctement imposée par les couches d'alignement aux cristaux liquides et valide les étapes de fabrications du transducteur. L'intégration de la membrane de nitrure de silicium n'altère donc ni l'alignement, ni la transparence par rapport à la cellule à cristal liquide « basique ».

L'étude fonctionnelle en présence d'un champ électrique a permis de valider la fonction même d'interrupteur optique électriquement contrôlé du transducteur. Il en ressort deux caractéristiques essentielles. D'une part, l'ajout de la membrane et du module fluide par rapport à une cellule basique n'atténue que faiblement le champ électrique, ce qui peut être compensé par une intensification convenable de la tension appliquée. D'autre part, la sensibilité du dispositif donnée par sa raideur électro-optique n'est pas perturbée par la présence de l'interface et du milieu de culture. Des études supplémentaires ont montré que l'épaisseur de la membrane dans la gamme testée (de 100nm à 800nm) n'avait pas d'influence sur la raideur électro-optique, mais que la fréquence en avait une, par conséquent il n'y a qu'une plage limitée de fréquence pour laquelle la pente est maximale, correspondant au maximum d'anisotropie diélectrique. Cette plage est comprise entre 100Hz et 10KHz pour le cristal liquide PCH5 et fixe la fréquence optimale centrée sur cette plage à 1KHz.

Enfin une dernière série de mesures a permis de comparer les performances du cristal liquides PCH5 utilisé par défaut pour toutes les caractérisations à celles du cristal liquide E7 utilisé pour l'étude théorique. Les résultats obtenus pour le dispositif E7 sont proches des valeurs théoriques et confirment que ce cristal liquide est adapté à la détection future des signaux neuronaux.

A ce stade, les différentes étapes de développement du dispositif peuvent être résumées de la manière suivante :

Étapes validées :

- Fabrication d'un prototype répondant au cahier des charges initiales
- Transparence optique
- Capacité à traduire des signaux électriques en variation d'intensité optique avec une sensibilité adaptée à la détection de signaux neuronaux.

Caractéristiques du dispositif restantes à évaluer (sans les neurones biologiques)

- Preuve de concept : capacité à détecter un signal électrique local de type signal neuronal
- Résolution spatiale : distinguer un neurone de son voisin
- Dynamique de fonctionnement : résoudre temporellement un signal de type neuronale.

En présence des neurones

- Biocompatibilité du nitrure de silicium avec les neurones biologiques.
- Enregistrement de l'activité neuronale

L'étape suivant directement cette première série de caractérisations consiste à obtenir la preuve du concept de notre dispositif à détecter un signal électrique localisé de type activité neuronal. La difficulté de cette étape réside dans l'application locale d'un champ électrique faible et localisé dans la configuration actuelle du dispositif. Ce champ électrique doit être adressé à proximité, voir en contact, avec la membrane et la technique mise en œuvre ne doit pas perturber la transparence globale du dispositif. L'utilisation de micro pointes par exemple est à proscrire pour ces raisons. Nous présentons dans la partie suivante l'outil de caractérisation microfluidique développé capable de mimer l'activité électrique d'un neurone afin de tenter d'évaluer, en l'absence de neurones biologiques, la sensibilité du dispositif à une variation locale de champ électrique de faible intensité et ses caractéristiques générales de détection.

II. Neurone artificiel

Dans cette partie nous allons présenter une stratégie alternative de caractérisation du transducteur développé pouvant être conduite en l'absence d'échantillons neuronaux. Les travaux ont été menés dans le cadre d'un stage de master au sein de l'équipe en étroite synergie avec ce projet de thèse.

La stratégie développée était basée sur l'utilisation d'une puce microfluidique dont les dimensions et les commandes devaient permettre de mimer la présence d'un neurone au-dessus de la membrane interfaciale et de commander son état d'activité électrique. Le but ultime était de disposer d'une plateforme de caractérisation où les caractéristiques fonctionnelles du transducteur pouvaient être investiguées en profondeur avant la phase de tests avec des neurones biologiques.

Nous avons alors baptisé cette variante de caractérisation « caractérisation par neurone artificiel ». Dans cette partie, nous allons tout d'abord rappeler le principe général de cette approche avant de décrire en détails la conception et la réalisation de la puce microfluidique utilisée. Les premiers résultats obtenus seront présentés et discutés à la fin de cette partie.

A. Présentation de la plateforme microfluidique

1. Principe général

Afin de caractériser la résolution spatiale et temporelle de notre transducteur et sa capacité même à traduire les signaux neuronaux, nous avons choisi de mimer le comportement électrique d'un neurone grâce à une plateforme microfluidique interfacée au dispositif. La stratégie adoptée consiste à utiliser l'écoulement laminaire d'un flux de faible conductivité électrique formant un canal large (100 μm à 1000 μm de diamètre) pour confiner en son sein un fluide conducteur sous forme d'un canal plus étroit de 10 μm (dimension caractéristique d'une cellule neuronale que l'on peut contrôler et faire varier), comme illustré sur la Figure 82. L'application d'un champ électrique approprié dans les puits de chargement du canal fluide central en contact avec la membrane crée une différence de potentiel entre ce canal central et le milieu qui l'entoure. Cette variation locale du potentiel doit permettre de réorienter les molécules de cristaux liquides sous-jacentes, transmettant sélectivement sur cette zone plus de lumière en sortie du transducteur.

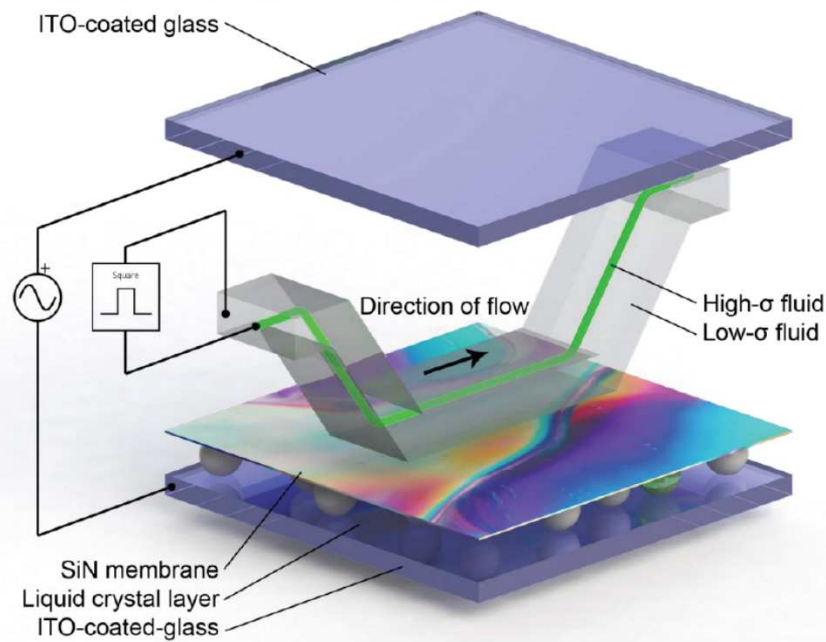


Figure 82 Caractérisation du dispositif par la stratégie du neurone artificiel. Un fluide conducteur est confiné près de la membrane de nitrure de silicium sous forme d'un canal micrométrique (en vert) au sein d'un liquide de moindre conductivité électrique. Un signal électrique alternatif créneau est appliqué entre le fluide confiné et le milieu l'entourant pour simuler l'activité électrique neuronale.

L'application d'un signal électrique avec les caractéristiques adaptées devrait nous permettre de modéliser au mieux les signaux neuronaux et ainsi évaluer la capacité du dispositif à les distinguer, et déterminer ses limites de performances. De plus, en contrôlant la géométrie et notamment la largeur du canal nous pourrions tester les limites de la résolution spatiale du dispositif.

L'application d'une fonction créneau devrait permettre de valider plusieurs aspects de la modélisation des signaux neuronaux. Tout d'abord, la nature transitoire de ce type de signaux se rapproche au mieux de l'aspect en « trains d'ondes » des signaux neuronaux, que ce soient des *bursts* de potentiel d'action, ou des potentiels de champ locaux. (Voir chapitre 1). En contrôlant la largeur, l'amplitude et la période des pulses, on peut évaluer le fonctionnement du dispositif dans le domaine fréquentiel et ainsi déterminer d'une part son seuil de détection et d'autre part sa résolution temporelle. Par ailleurs, un signal pulsé devrait permettre d'éviter les effets électrocinétiques causés par l'application d'un champ électrique continu, même de faible intensité, dans le canal fluide.

Afin de réaliser un tel modèle de l'activité neuronale, nous avons cherché à confiner un canal fluide de dimension micrométrique dans un fluide de gaine grâce au confinement fluide hydrodynamique. Cette technique, plus connue sous son appellation anglophone « *hydrodynamic flow focusing* » est un puissant outil utilisé en microfluidique pour des applications variées comme le mélange ou la séparation de fluides [184], l'analyse et le dénombrement de cellules [185], ou encore la cytométrie en flux [186]. Le confinement hydrodynamique est classiquement obtenu dans un circuit microfluidique à trois entrées, dans lequel le fluide d'intérêt est maintenu dans une configuration de type cœur-gaine par deux fluides latéraux, comme illustré Figure 83.

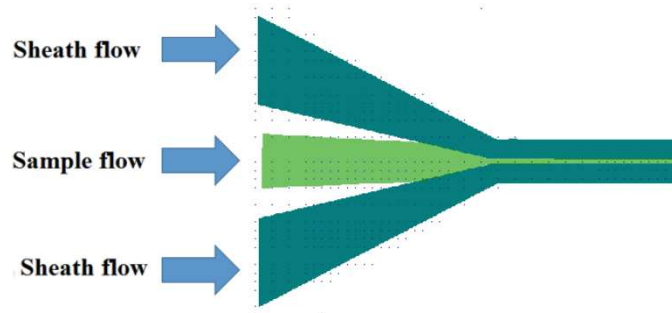


Figure 83 Schéma illustrant la technique d'un confinement hydrodynamique simple: le fluide "cœur" (sample flow) est confiné latéralement par deux arrivées latérales d'un fluide "gaine" (sheath flow).

C'est la différence de vitesse d'écoulement de ces fluides injectés côte à côte dans un même canal qui conditionne cette focalisation fluide. Le fluide de cœur est généralement la solution ou suspension à analyser. Elle peut être homogène (plasma sanguin [187]) ou multiphase (particules suspendues dans un fluide) comme c'est le cas pour la cytométrie de flux, très utilisée en biologie pour compter, trier ou détecter toute sorte de cellules [188][189][190]. Cette technique peut également servir à la génération de gouttelettes [191]. Une revue complète et documentée des techniques de « *flow focusing* » est donnée ici [192].

2. Contraintes géométriques et matériaux.

L'outil de caractérisation à réaliser pour simuler le comportement électrique d'un neurone est donc un circuit microfluidique à interfacier sur la partie électro-optique du transducteur, i.e., directement sur la membrane en nitrure de silicium au fond du puits. Nous rappelons que les membranes ont été obtenues par une succession de gravure par ablation laser et de gravure KOH d'un échantillon carré de silicium, procurant au puits ainsi créé des flancs inclinés. (Voir chapitre 3 sur la fabrication des membranes). Cependant les deux techniques de gravure utilisées n'induisent pas la même inclinaison des flancs (un angle de 19° résulte de l'ablation laser alors que la gravure au KOH du silicium <100> aboutit à des flancs inclinés à $54,7^\circ$). Pour pallier à cette discontinuité des parois de la cavité, les membranes utilisées pour caractériser le dispositif selon cette technique ont été volontairement surgravées lors de la gravure KOH pour « gommer » l'angle induit par l'ablation laser et n'obtenir que des parois uniformes formant un angle de $54,7^\circ$ avec le plan <111> du silicium.

La géométrie du puits ainsi formé conditionne et contraint la conception de la puce microfluidique. En effet, le fluide à confiner doit être guidé au fond du puits pour être directement en contact avec la membrane de nitrure de silicium. Pour guider le fluide vers le fond de la cavité, nous avons opté pour une pyramide tronquée ayant une forme complémentaire à celle du puits, et qui viendrait s'encastrier de manière à ce que la face tronquée de la pyramide et la membrane forment un canal microfluidique d'une centaine de microns de hauteur. Le fluide est ensuite redirigé vers une chambre de sortie, située en haut de la cavité, en suivant la paroi opposée comme illustré Figure 82.

Pour répondre à toutes ces contraintes de conception, nous avons procédé à la fabrication de la plateforme microfluidique par moulage. Dans la suite de ce paragraphe, nous serons donc amenés à évoquer tantôt la plateforme microfluidique recherchée tantôt son moule négatif à partir duquel nous effectuerons la (ou les) étape(s) du moulage. De même, sur la Figure 84 ci-après, nous illustrons respectivement des zones d'intérêts dans le moule négatif ou dans le circuit final.

Le matériau de choix pour réaliser un tel circuit microfluidique est le polydiméthylsiloxane (PDMS), pour ses propriétés de biocompatibilité et de perméabilité gazeuse comme nous l'avons cité en amont de ce chapitre section I.A. De plus, dans ce cas précis d'un circuit microfluidique plutôt complexe, le

PDMS se distingue par sa flexibilité [193], sa transparence optique et enfin sa capacité de moulage de diverses formes 3D de façon conforme, et ce pour des dimensions allant de quelques mm à quelques centaines de nanomètres [194][195].

3. Conception du confinement hydrodynamique

Comme illustré Figure 84 le confinement microfluidique du canal visé s'effectuera en amont de la cavité sur le partie plane non gravée du substrat de silicium, pour être amené ensuite au fond de la cavité au plus près de la membrane en nitrure de silicium.

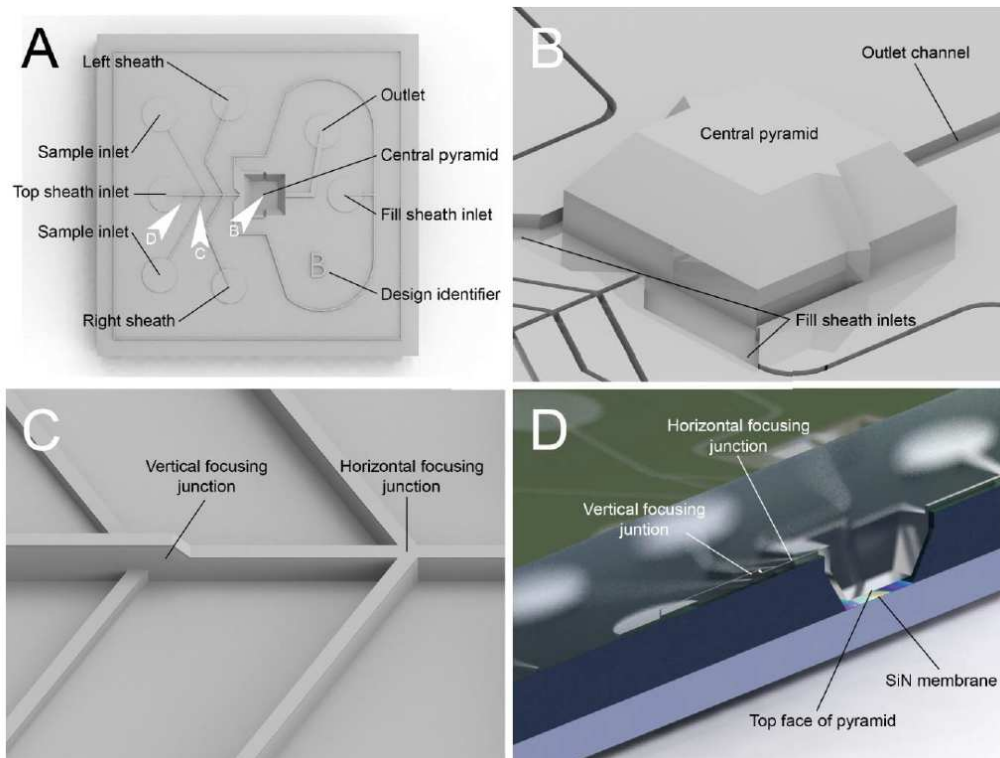


Figure 84 Schéma de la plateforme microfluidique finale. (A) Vue générale du moule ayant servi à fabriquer le circuit en PDMS. Les flèches blanches numérotées B, C et D indiquent les perspectives des zones qui ont été agrandies dans les encarts du même nom. (B) Vue du circuit positif final centrée sur la pyramide. (C) Vue des jonctions accomplissant le confinement vertical puis latéral du fluide. Comme pour (A), l'image (C) est une vue du moule négatif du circuit permettant un meilleur aperçu des canaux. (D) Vue en coupe du circuit en PDMS interfacé au dispositif à cristaux liquides, laissant apparaître le canal de 100µm de hauteur formé entre la face tronquée de la pyramide et la membrane de nitrure de silicium.

Après une revue des techniques de confinement fluide existantes dans la littérature [192], nous avons choisi de nous orienter vers un circuit microfluidique à un seul niveau pour éviter les complications liées à la fabrication de circuits multicouches. La principale exigence de la jonction de confinement est de concentrer sur un canal d'environ 10µm (dimension typique moyenne d'un neurone) un fluide conducteur au sein d'un fluide de moindre conductivité formant un canal plus large. Il faut donc confiner ce flux d'une part verticalement pour qu'il soit en contact avec la membrane en nitrure de silicium, et d'autre part latéralement pour contrôler sa largeur. Enfin, ce confinement bidirectionnel doit s'effectuer avec deux embranchements distincts afin de décorréliser chacun de ces paramètres.

Le confinement vertical est obtenu après la première intersection, grâce à une marche intégrée dans le canal principal (Figure 84 (c)). Le fluide de faible conductivité jouant le rôle de gaine est alors inséré par un puits de chargement (*top sheath inlet*) dans un canal large (150µm de haut par 50µm de large), puis le fluide de cœur est inséré latéralement par le biais de canaux de même largeur d'une

hauteur de $50\mu\text{m}$ (*sample inlet*). Une fois confiné et maintenu en dessous du fluide de gaine grâce à la marche, le fluide de cœur est ensuite concentré horizontalement par l'arrivée de deux canaux latéraux (*left and right sheath*). Ces canaux latéraux rejoignent le canal central avec un angle de 60° , valeur optimale trouvée dans la littérature pour un bon confinement [196]. En effet, l'analyse des travaux antérieurs indique qu'un angle inférieur de 30° induirait une mauvaise focalisation du fluide et un angle de 90° induirait la formation de gouttelettes rondes ou allongées selon le ratio de débit des deux fluides [197].

Une fois la focalisation du fluide cible au sein de son fluide gaine obtenue, il faut maintenir ce confinement étroit jusqu'à la membrane au fond de la cavité. En sortie du croisement assurant le confinement horizontal (*horizontal focusing jonction*), l'écoulement doit passer d'un canal étroit de $50\mu\text{m}$ de largeur par $100\mu\text{m}$ de hauteur, à un canal de $100\mu\text{m}$ de hauteur et $2000\mu\text{m}$ de largeur (largeur du puits). Pour éviter que le fluide focalisé ne se dissipe à cause de ce changement de géométrie, deux autres canaux latéraux de chargement (*fill sheath inlets*) ont été rajoutés à l'entrée de la pyramide afin d'apporter un volume important du fluide « de gaine » permettant de maintenir la focalisation. Injecté au même débit que l'écoulement amont, ce rechargement permet de maintenir constant le profil de concentration du fluide confiné tout le long de la membrane comme nous le verrons dans les simulations menées par la suite section II.B.4.

Enfin, des ailettes souples ont été intégrées aux faces latérales de la pyramide afin de permettre un bon scellement entre le PDMS et la cavité de la membrane et forcer le fluide à s'écouler sous la pyramide exclusivement, et non pas à la contourner latéralement ce qui élargirait le profil de focalisation du fluide cœur (Figure 84 (b)). De plus, la forme triangulaire et l'angle de 30° de ces ailettes en PDMS leur confère une flexibilité relative leur permettant de s'adapter aux légères variations de géométries et à la rugosité de surface ($\sim 3\mu\text{m}$) des faces des puits inévitablement induites par l'étape de gravure. Afin d'éviter le contact direct avec la membrane et de maintenir une hauteur de canal cohérente le long de cette dernière ($100\mu\text{m}$), les ailettes sont tronquées à la même hauteur que le sommet de la pyramide.

Les caractéristiques et dimensions de cette plateforme microfluidique ont été conçues après une revue de la littérature du domaine et en fonction des contraintes de notre cahier des charges. A ce stade de conception, nous avons alors fait appel aux simulations par éléments finis pour prédire le fonctionnement microfluidique et affiner la conception et les performances de cette plateforme.

B. Simulation par CFD (*Computational fluid dynamics*)

Des simulations par la méthode des éléments finis ont été menées grâce aux modules d'écoulement microfluidique, de transport d'espèces en solution et au module électrique du logiciel Comsol multiphysics.

1. Simulation multiphysique

Pour estimer les performances de notre plateforme microfluidique, nous avons utilisé des simulations multiphysiques. Ces dernières sont nécessaires lorsque plusieurs phénomènes physiques, décrits par des grandeurs dépendantes, interviennent dans le problème à résoudre. Le couplage de ces grandeurs peut être plus ou moins important, et peut dans certains cas être négligé lorsqu'il est suffisamment faible pour simplifier les calculs. Le principe de base de la modélisation multiphysique consiste à faire appel à plusieurs équations aux dérivées partielles. Dans notre cas, le problème repose sur les équations de Navier-Stokes pour l'écoulement fluide et le transport d'espèces diluées d'une part et les équations de Maxwell pour l'application du champ électrique d'autre part.

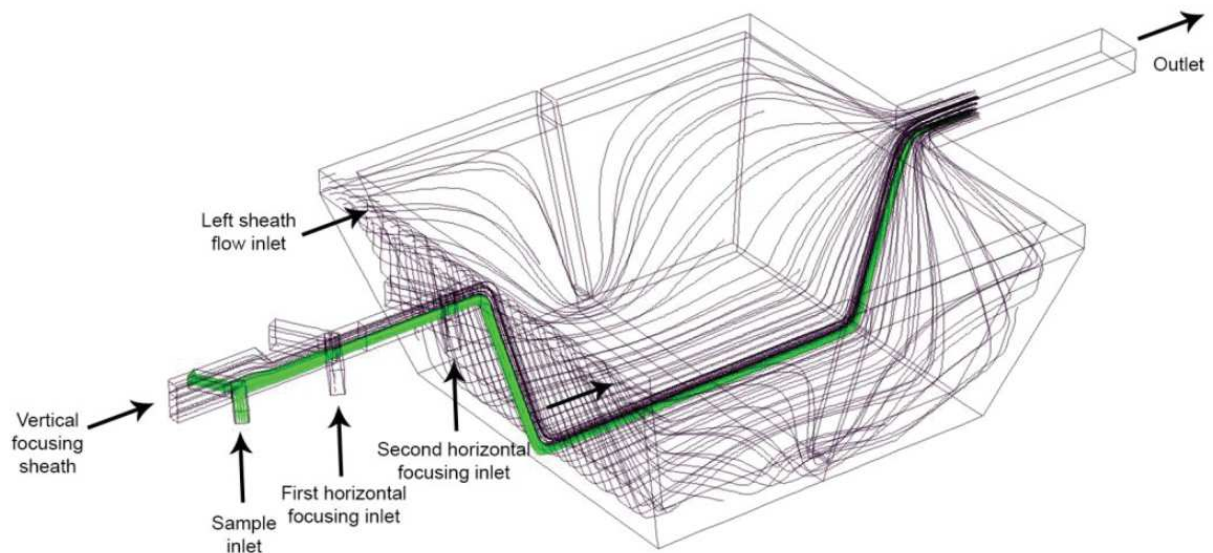


Figure 85 Vue d'ensemble du modèle simulé par éléments finis. Les lignes de courant représentent l'écoulement fluide. Le fluide cœur est représenté en vert.

Ainsi, le profil de vitesse de l'écoulement est d'abord calculé en tout point de la structure, puis utilisé pour résoudre les équations de transport d'espèces en solution. C'est en effet la vitesse de l'écoulement qui dicte le transport des espèces. C'est le profil de concentration des espèces en solution qui sera examiné dans les résultats présentés pour évaluer le confinement du fluide de cœur. De la même façon pour la simulation électrique, il faut partir du profil de concentration des espèces pour analyser les effets du champ électrique appliqué.

C'est l'hypothèse d'un couplage faible entre chacune de ces grandeurs qui permet une résolution séquentielle, car en réalité l'ajout d'espèces diluées dans un fluide peut en modifier les caractéristiques tel que la vitesse d'écoulement. Or nous nous plaçons dans l'hypothèse d'un régime dilué, négligeant l'influence des espèces sur l'écoulement. Il en est de même pour l'application du champ électrique au sein du circuit, les forces électrocinétiques peuvent affecter le transport des espèces ou l'écoulement du fluide. Nous nous basons cependant sur l'hypothèse qu'un champ alternatif n'affectera pas les comportements précédents, ce qui permet de traiter chaque étape indépendamment l'une de l'autre. Par ailleurs notons qu'une attention particulière devra être apportée au choix des électrodes d'application du champ électrique afin d'éviter d'éventuels effets électrochimiques.

Les étapes à suivre pour la résolution du modèle créé consistent à renseigner au logiciel une géométrie de circuit, puis les caractéristiques des fluides utilisés, les conditions aux limites et enfin de définir une maille de découpage par éléments finis pour la résolution des équations par le logiciel.

2. Aspect numérique : le maillage

La méthode des éléments finis est une méthode numérique qui permet de fournir une solution approchée aux problèmes pouvant être modélisés par des équations aux dérivées partielles, complétés de conditions aux limites. Elle s'applique aujourd'hui à une large classe de problèmes physiques, incluant notamment l'électromagnétisme [[198], les transferts de chaleur [199] et l'élasticité mécanique [200]. L'idée fondamentale de la méthode des éléments finis consiste à discrétiser spatialement le domaine de calcul en sous domaines de formes géométriques simples, appelées mailles.

La discrétisation spatiale ou maillage est une étape importante dans la résolution numérique du modèle. Son choix est un compromis entre la précision de la solution calculée, et le temps de calcul. Un maillage très résolu avec de petites mailles conduira à une solution plus précise, mais induira des temps de calculs démesurément longs [201][202].

Pour obtenir un maillage optimisé, un processus classique consiste à définir un premier découpage simple choisi automatiquement par le logiciel, puis de le raffiner en augmentant progressivement sa résolution, jusqu'à ce que la solution du modèle obtenue avec le dernier découpage n'améliore plus significativement la précision de la solution précédente, fournissant ainsi la solution exacte du modèle.

Dans notre cas il faut en effet que le découpage en éléments finis choisi soit optimisé au voisinage des points d'intérêts de la structure, à savoir tout le long du fluide confiné central, depuis la jonction hydrodynamique jusqu'à sa sortie, et ce de manière à ne pas risquer de « lisser » artificiellement le profil de concentration des espèces obtenu en grandeur de sortie de la simulation.

Des exemples de maillages testés non adaptés sont donnés Figure 86 (A et B) en comparaison avec le maillage de qualité choisi Figure 86 C.

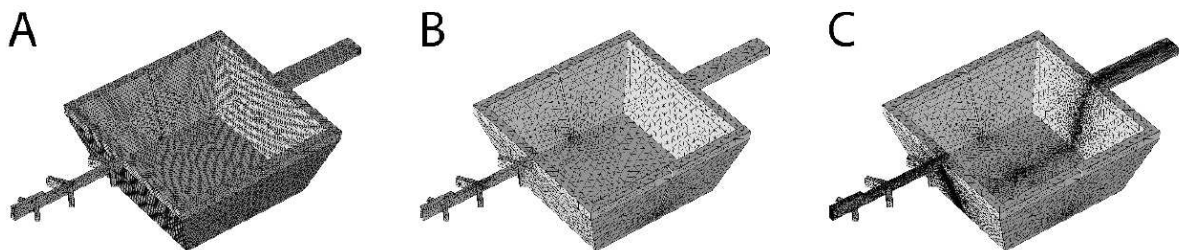


Figure 86 Différentes solutions de maillage de la structure simulée par Comsol multiphysics. (A) Un premier maillage fourni automatiquement par défaut par COMSOL. Ici, les éléments du maillage sont trop gros pour résoudre correctement les détails du modèle au niveau de la zone centrale d'intérêt (autour du fluide central confiné), et trop petits vers l'extérieur de la structure induisant des calculs très lourds. (B) Un maillage globalement moins dense que le premier est présenté ici, avec une concentration de mailles plus petites près des structures complexes et de la jonction, mais toujours insuffisamment précis pour résoudre correctement le modèle le long du canal central. (C) Le découpage en éléments finis final, avec une forte densité de petites mailles autour de la jonction et du fluide de cœur, et des mailles de plus en plus grande vers les bords latéraux de la structure, évitant ainsi d'accorder trop de ressources de calcul aux zones de moindre intérêt.

Pour obtenir un tel maillage optimisé, une expression dédiée fournie par le logiciel permet d'obtenir des mailles fines ($5\mu\text{m}$) près de la région d'intérêt, et de plus en plus grandes (jusqu'à $100\mu\text{m}$) au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la zone centrale :

$$\delta(x) = \delta_{max} - (\delta_{max} - \delta_{min}) \times e^{-kx^2} \quad (34)$$

Où $\delta(x)$ est la taille de la maille en fonction de sa distance x par rapport à l'axe central de la structure, δ_{max} est la taille de la plus grande maille, δ_{min} est la taille de la plus petite maille et k est un coefficient qui contrôle le degré de rapidité avec lequel $\delta(x)$ augmente selon l'éloignement à l'axe central x .

La géométrie du maillage obtenu grâce à cette fonction est donnée Figure 87. La courbe représentant la taille caractéristique d'une maille en fonction de sa distance à l'axe central de la structure est superposée en rouge sur la même figure et révèle une distribution gaussienne et une taille de maille minimale de $5\mu\text{m}$.

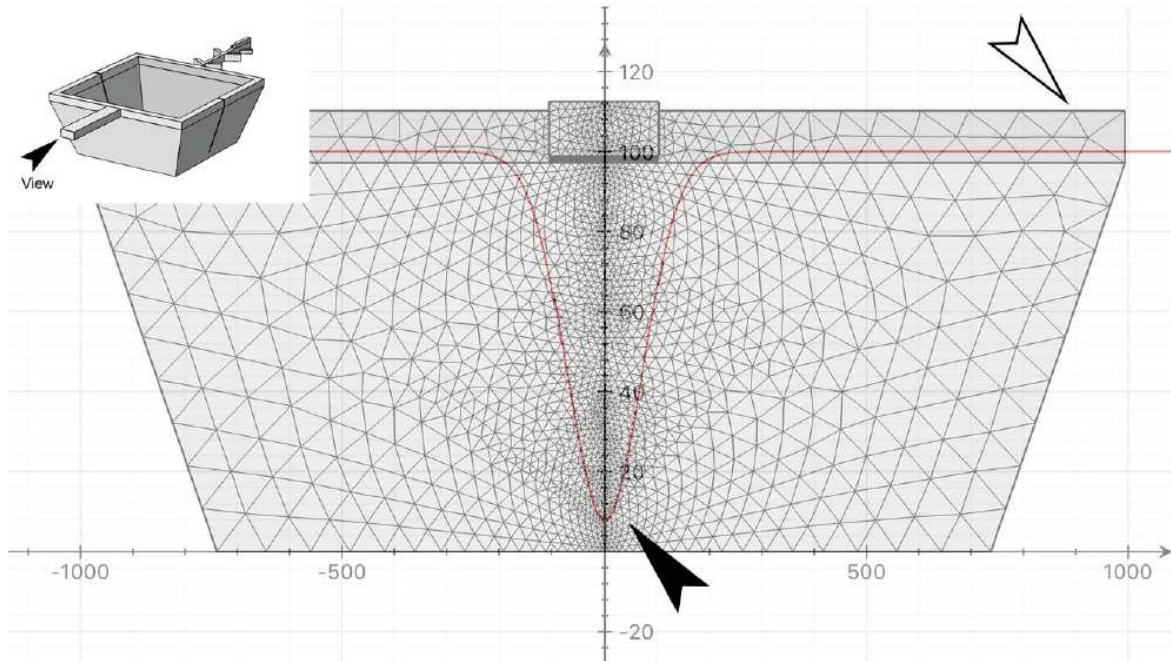


Figure 87 Vue en coupe de la structure montrant le découpage géométrique final en éléments finis utilisé pour réaliser les simulations. La dimension de la structure et la taille effective des mailles sont à relier à l'axe des abscisses (en μm). La courbe en rouge et l'axe gradué vertical ont été superposés et représentent l'évolution de la taille des mailles (μm) en fonction de la distance à l'axe central. La flèche noire indique la plus petite maille localisée sur l'axe de confinement fluide, et inversement la flèche blanche indique une plus grande maille vers l'extérieur de la structure. L'encart en haut à gauche donne une vue d'ensemble de la structure et l'orientation de la vue en coupe donnée.

Pour confirmer que ce découpage en éléments finis est correctement optimisé, une seule simulation a été menée avec un maillage présentant la plus petite taille de maille ($5\mu\text{m}$) sur l'ensemble de la structure à titre de comparaison avec ce maillage optimisé. Les résultats du modèle obtenus se sont avérés identiques, validant alors ce découpage adapté pour notre structure.

3. Paramètres de l'écoulement.

L'écoulement d'un fluide à l'échelle micrométrique implique que les effets de surface deviennent relativement plus importants par rapport aux effets liés au volume du fluide. Par conséquent, les forces de viscosité liées aux forces de cisaillement près de la surface deviennent prédominantes devant les forces inertielles liées au volume (à l'origine de la turbulence). Le rapport entre ces deux forces est caractérisé par le nombre de Reynolds qui est typiquement faible en microfluidique traduisant un régime d'écoulement laminaire dominant en opposition au régime d'écoulement turbulent ($Re \gg 1$). La transition entre les deux régimes se situe pour des valeurs du nombre de Reynolds situées entre 2300 et 2600, valeur connue sous le nombre critique de Reynolds.

Le nombre de Reynolds est défini par :

$$Re = \frac{\rho UL}{\mu} \quad (35)$$

Avec ρ la densité du fluide, U la vitesse caractéristique de l'écoulement, μ la viscosité et L la dimension caractéristique du canal fluide. Par convention, L sera prise comme étant la plus petite longueur des dimensions du circuit microfluidique [203].

Dans notre cas, les fluides utilisés présentent les caractéristiques rappelées dans le Tableau 9. La différence de conductivité entre les deux fluides est gérée par la concentration d'ions en solution.

Tableau 9 paramètres caractéristiques des fluides utilisés pour la mise en œuvre du confinement hydrodynamique dans la plateforme microfluidique

Densité	Vitesse d'écoulement	Viscosité	Longueur caractéristique
$1 \times 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$	47 mm.s^{-1}	$8,9 \times 10^{-4} \text{ Pa.s}$	$50 \text{ }\mu\text{m}$ ou $100 \text{ }\mu\text{m}$

Dans le cas du canal central de la jonction hydrodynamique de $50 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, le nombre de Reynolds associé est :

$$Re = \frac{1.10^3 \times 4,7.10^{-2} \times 50.10^{-6}}{8,9.10^{-4}} = 2,64 \quad (36)$$

En sortie de la jonction hydrodynamique, la plus petite dimension du canal devient sa hauteur qui est égale à $100 \mu\text{m}$. Le nombre de Reynolds associé devient alors :

$$Re = \frac{1.10^3 \times 4,7.10^{-2} \times 100.10^{-6}}{8,9.10^{-4}} = 5,28 \quad (37)$$

Ces valeurs confirment bien le régime laminaire de l'écoulement dans les différentes parties de notre circuit microfluidique.

4. Résultats

Différentes géométries et dimensions de la puce microfluidique ont été testées avant d'aboutir à la forme optimale présentée précédemment. Pour chacune de ces géométries, une étude paramétrique a été menée et les paramètres suivants ont été balayés :

- Le débit du fluide de cœur (*Sample inlet flow*) φ_0
- Le débit du fluide de gaine pour le confinement vertical (*Vertical focusing sheath*) : $\varphi_{\text{vertical}}$
- le débit des canaux gauche et droit pour le confinement horizontal (*first horizontal focusing*) : φ_{left} et φ_{right} (à noter que ces écoulement auront le même débit si le fluide cible est centré latéralement)
- le débit du fluide de rechargement en amont de la descente dans la cavité de la membrane, aussi appelé deuxième confinement horizontal : φ_{fill}
- Les dimensions du canal microfluidique (hauteur et largeur)

Pour un système à m variables pouvant chacune prendre n valeurs, nous obtiendrions n^m solutions différentes. Nous avons restreint ce système en limitant judicieusement les valeurs pouvant être prises par chacune de ces 6 variables pour réduire le nombre de solutions et les temps de calculs en :

- Ne prenant en compte que des valeurs cohérentes et en accord avec ce qui a pu être trouvé dans la littérature pour chacun des paramètres. Par exemple les dimensions du canal microfluidique sont compris entre $20 \mu\text{m}$ [204] et $200 \mu\text{m}$ [205] pour la plupart des systèmes de confinement hydrodynamique explorés [189][206].
- En optimisant le découpage en éléments (*mesh*) pour la résolution de la simulation. (Voir paragraphe précédent)

La grandeur en sortie de simulation que nous considérons est le profil de concentration des espèces du canal en sortie de la jonction de confinement hydrodynamique. Un exemple du profil de concentration obtenu est donné sur la Figure 88 avec la vue en coupe du canal en sortie de la jonction.

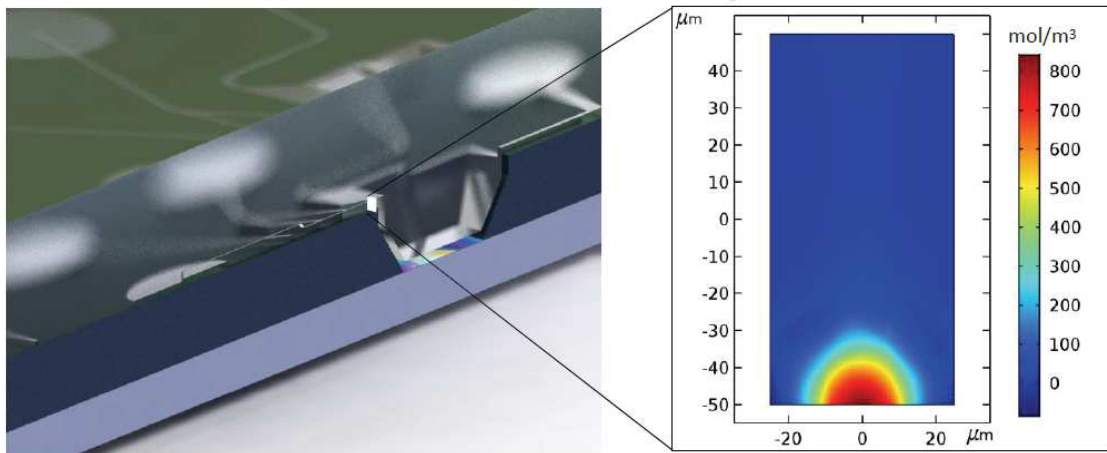


Figure 88 Gauche : Vue en coupe du circuit le long de l'axe principal. Le profil de concentration des espèces est tracé sur une tranche du canal principal, après les intersections de confinement. Droit : Un exemple de profil de concentration donné par la simulation dans cette zone. La concentration initiale du fluide cible injecté est de 6000 mol.m^{-3} dans ce cas.

Pour quantifier l'efficacité du confinement de l'écoulement, nous avons opté pour le paramètre largeur à mi-hauteur (FWHM) du profil de concentration d'espèces issu des calculs par éléments fini de chacune des géométries considérées. L'évolution des différentes géométries est donnée Figure 89. Le profil de confinement du canal atteint une valeur minimale de $17,5 \mu\text{m}$ de largeur à mi-hauteur (FWHM) après les nombreuses itérations. Pour les premières géométries obtenues non optimisées, le profil de concentration a été tracé seulement sur la partie supérieure du circuit, avant la descente de l'écoulement au fond du puits.

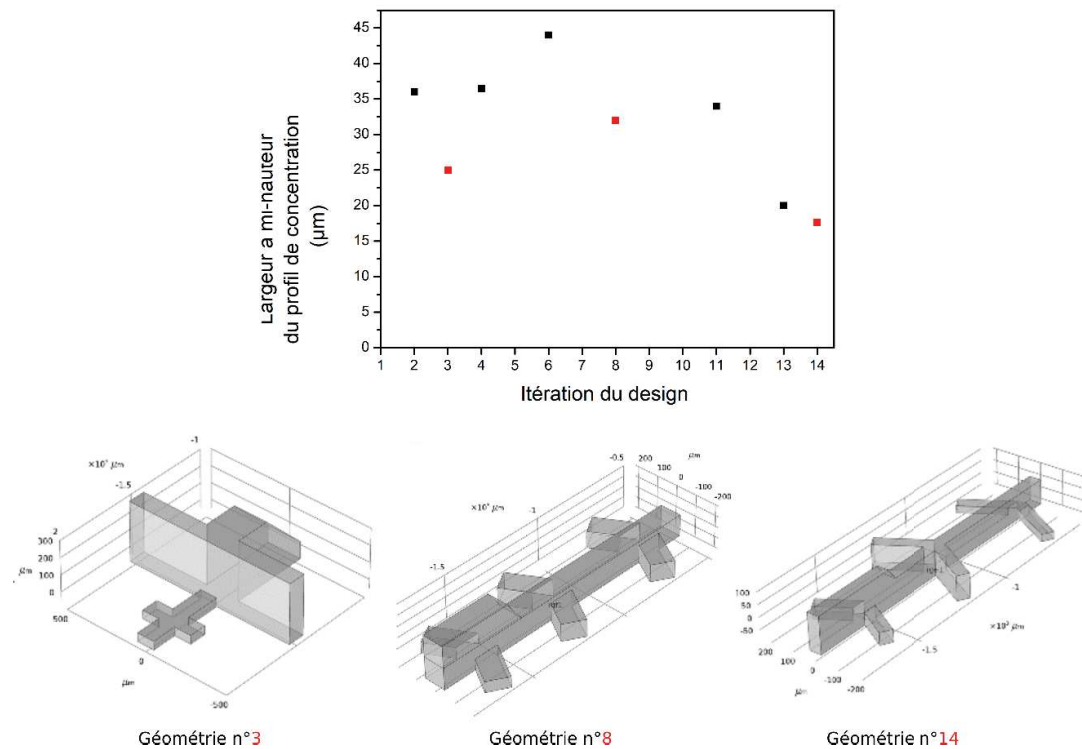


Figure 89 Evolution de la performance du confinement fluide en fonction des différentes géométries testées. En haut : courbe représentant la largeur à mi-hauteur du profil de concentration dans le canal principal après confinement en fonction de l'évolution de la géométrie du circuit. En bas : 3 exemples de géométries testées correspondant à leur itération dans la courbe et illustrant l'évolution de l'allure de la jonction hydrodynamique. La géométrie n°14 est celle retenue.

Pour le modèle raffiné obtenu après une succession d'itérations, nous avons inclus la deuxième partie du circuit où l'écoulement descend en contact avec la membrane. Nous constatons Figure 90 que le rajout de cette deuxième partie du circuit ne modifie pas le profil de concentration du canal. Le confinement du fluide cible est conservé au contact de la membrane au fond de la cavité.

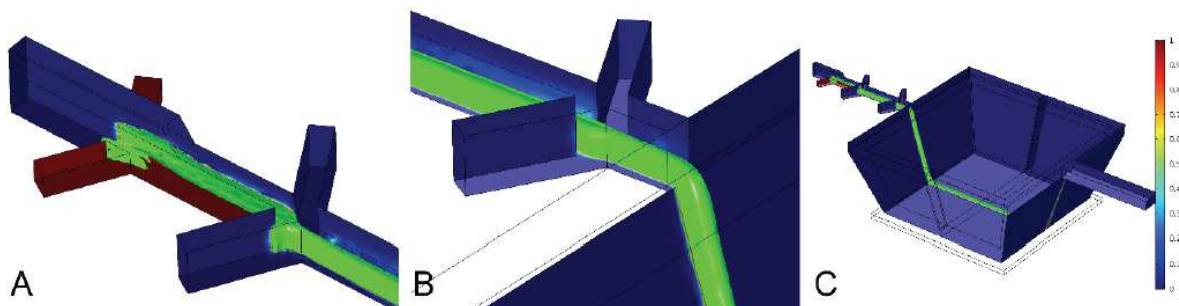


Figure 90 Simulations Comsol montrant la répartition de la concentration en ions dans le canal principal du circuit, normalisée par rapport à son maximum. (A) Vue des intersections de confinement vertical et latéral. (B) Deuxième intersection de confinement latéral. (C) Vue générale du modèle permettant de voir que le fluide reste confiné lorsqu'il est dirigé au fond du puits.

Après que la géométrie optimale ait été fixée (cf. géométrie 14, Figure 89), nous avons étudié l'influence du débit des différents flux sur l'efficacité du confinement hydrodynamique. Les résultats des 90 combinaisons testées sont présentés Figure 91.

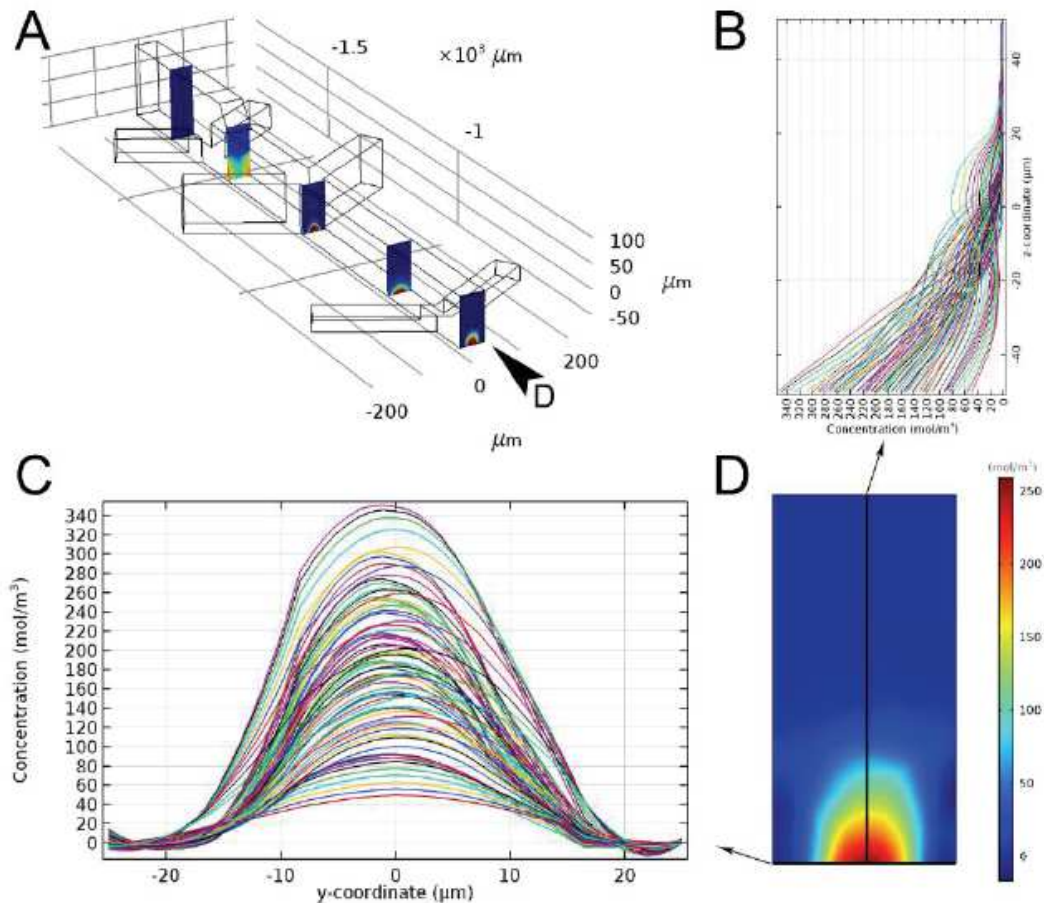


Figure 91 (A) Vue d'ensemble du confinement hydrodynamique du circuit final modélisé sous Comsol. (B) et (C) regroupent les profils de concentrations de chacune des 90 combinaisons de valeurs de débits testées. Ces profils sont tracés respectivement le long de la hauteur (B) et de la largeur du canal (C) au niveau de la flèche indiquée en (A). (D) Cartographie du profil de concentration révélant le meilleur confinement des 90 combinaisons de débits testées.

Le profil de concentration est donné pour la combinaison de valeurs qui induit le confinement le plus étroit, soit une largeur à mi-hauteur de 17,6μm. Ces valeurs optimisées sont résumées dans le Tableau 10 ci-dessous, et seront utilisées pour les expériences à venir.

Tableau 10 Valeurs optimales des débits à imposer dans la plateforme microfluidique telles qu'issues de la simulation par éléments finis dans la géométrie optimale retenue.

Débit du fluide cible	Débit du canal vertical	Débit des canaux latéraux gauche et droite	Débit canal de rechargement
0,6 μL.min ⁻¹	4 μL.min ⁻¹	4,8 μL.min ⁻¹	675,6 μL .min ⁻¹

C. Fabrication

➤ Choix du procédé de fabrication

Les simulations menées ont permis d'aboutir à un design et des dimensions optimales théoriques du circuit microfluidique. Cependant, il nous faut anticiper un éventuel écart entre les résultats de ses simulations et la réalisation de la puce, les modèles même les plus précis ne correspondant que rarement exactement à la réalité. Par conséquent, le premier prérequis pour le choix de la technique de fabrication du circuit est d'être rapide et facilement malléable afin de disposer d'une marge d'ajustement pour d'éventuelles rectifications de la géométrie ou des dimensions du circuit.

De plus, le circuit microfluidique fabriqué doit être capable d'assurer l'écoulement laminaire des fluides introduits malgré une éventuelle rugosité de surface de ces canaux et de s'interfacer correctement au dispositif malgré d'éventuelles variations géométriques même infimes dus aux aléas de fabrication de ce dernier.

Bien que les procédés classiques de soft lithographie soient traditionnellement utilisés pour la fabrication de circuits microfluidiques [207],[208] et correctement maîtrisée au sein de nos plateformes technologiques, cette approche ne laisse qu'une faible marge de manœuvre pour d'éventuels remodelages du design du circuit. En effet la fabrication du moule mère en SU8 à partir duquel est créé le circuit en PDMS final s'avère très chronophage dans le cas où plusieurs designs doivent être testés en raison des délais importants de fabrication des masques utilisés pour lithographier la SU8.

C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers une approche de stéréolithographie (plus communément appelée impression 3D) pour fabriquer une empreinte négative du circuit désiré que l'on appellera par la suite « moule mère ». Cette approche en pleine expansion se distingue par sa grande capacité de prototypage rapide permettant de tester facilement plusieurs géométries [209][210].

➤ Étapes de fabrication

La stéréolithographie, ou impression 3D, consiste à construire un objet par superposition successive de couches de matière, dans notre cas, une résine liquide dispensée, pixel par pixel, selon un ordre dicté par le dessin 3D de la géométrie désirée et photopolymérisée grâce à un flash UV. Une imprimante 3D Miicraft 125 Series SLA a été utilisée pour l'impression du moule mère dans la résine associée (Miicraft Clea Resin). Cependant, le PDMS ne peut être moulé directement sur un support ainsi obtenu car les solvants présents dans cette résine (même après photopolymérisation) dégazent et interfèrent avec la réticulation du PDMS. Il nous a alors fallu ajouter deux étapes de moulage intermédiaires avant d'obtenir la bonne copie en PDMS (bonne polarité) : le moule mère, négatif du circuit final, est d'abord imprimé par stéréolithographie et transféré dans un premier moule intermédiaire souple (MoldMax) qui permet un démoulage simple. Un deuxième moule, élaboré dans un autre polymère (Smoothcast), plus dur une fois réticulé et inerte vis-à-vis du PDMS, est ensuite moulé à partir du MoldMax et sert à son tour de moule pour produire le circuit final en PDMS. Les étapes de fabrication sont détaillées ci-après.

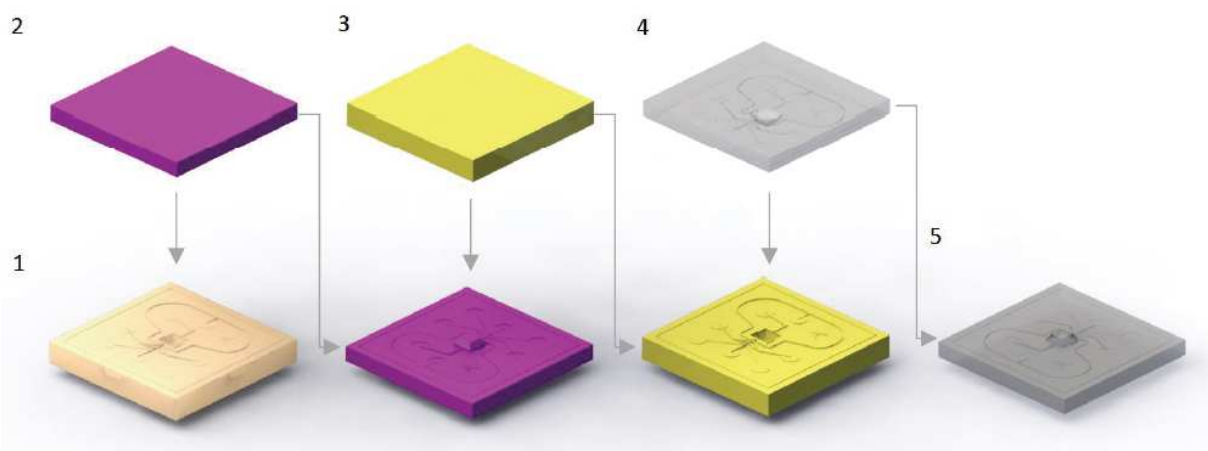


Figure 92 Étapes de fabrication du circuit final. (1) Un moule maître est fabriqué par impression 3D. (2) Un premier moule intermédiaire est fabriqué à partir du moule mère dans un polymère flexible appelé « Moldmax ». (3) Un deuxième moule intermédiaire en « Smoothcast » est fabriqué à partir du précédent. (4) Le PDMS est coulé et réticulé dans ce deuxième moule intermédiaire. (5) le circuit final en PDMS est prêt à être utilisé.

1) Préparation du circuit primaire

Tout d'abord, les circuits sont dessinés grâce à un logiciel de CAO Solidworks. Ils sont ensuite imprimés dans l'imprimante 3D Miicraft en utilisant la résine Miicraft Clear Resin BV-003. Des éléments individuels de volume (voxels) de $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ sont successivement photopolymérisés par des insulations aux UV. L'objet en cours d'impression reposant sur une platine motorisée est ensuite décalé de $30\mu\text{m}$ selon l'axe des z pour permettre de polymériser la couche suivante, et ainsi de suite. Pour contourner cette limitation de la résolution verticale à $30\mu\text{m}$, le déplacement vertical selon l'axe z a été ramené à $5\mu\text{m}$ tout en réduisant l'intensité de la source UV de manière à délivrer la bonne quantité d'énergie nécessaire à la polymérisation de la résine malgré l'exposition multiple.

En ce qui concerne l'orientation de l'objet, deux positions ont été testées. Une première avec une inclinaison de 30° de la pièce par rapport à la platine qui a été pressentie comme plus adaptée pour une meilleure évacuation de la résine non polymérisée. Cependant, il a été constaté que cette orientation induit un mauvais état de surface, la forme des voxels apparaissant très nettement comme le montre l'image MEB Figure 93(D). L'objet est alors placé à plat sur la platine pendant l'impression de toutes les couches constituantes du circuit primaire appelé aussi moule « mère ».

2) Préparation du premier moule intermédiaire flexible

Le premier moule intermédiaire est fabriqué dans un polymère siliconé (polysiloxane) réticulable souple : Moldmax 25 silicon rubber (Smooth-On, Inc.). Le précurseur et l'agent réticulant sont mélangés dans un ratio massique de 20 pour 1, puis dégazés sous vide pendant 10min. Le mélange est ensuite versé sur le moule maître et recuit pendant une nuit à température ambiante.

3) Préparation du second moule intermédiaire rigide

Ce premier moule souple est ensuite séparé de la pièce maitresse et un second polymère réticulable (polyuréthane) SmoothCast 300 (Bentley Advanced Materials) est préparé par adjonction d'un agent réticulant à un monomère. Cette mixture commence à durcir au bout de 7 min seulement, ce qui rend l'étape de dégazage pour l'évacuation de l'air piégé délicate. C'est pourquoi chacun des deux composants est dégazé séparément pendant 10min au dessiccateur avant d'être mélangé. Un nouveau dégazage de 3 minutes est alors nécessaire pour évacuer les éventuelles bulles d'air incorporées lors de l'homogénéisation, puis le Smoothcast est versé sur le moule souple Moldmax et laissé au repos pendant 2h pour une réticulation complète du polymère à température ambiante.

4) Préparation du circuit en PDMS

Le moule flexible en Moldmax (en violet sur la Figure 92) et le moule dur en Smoothcast (en jaune sur la Figure 92) sont alors séparés pour obtenir le moule dur négatif smoothcast qui servira à créer le circuit microfluidique final en PDMS. Le PDMS (Sylgard 184 silicone elastomere Dow Corning Corp.) est préparé la aussi par ajout d'un agent réticulant à un précurseur monomère dans un ratio massique de 1 pour 10, puis dégazé pendant 10min sous vide pour évacuer l'air emprisonné lors du mélange, qui est ensuite versé sur le moule négatif en Smoothcast. L'ensemble est placé dans une étuve portée à 80°C pendant 2h pour en permettre la thermo-réticulation.

5) Assemblage du circuit

Nous obtenons finalement le circuit microfluidique en PDMS en le libérant de son moule. Ce circuit final est ensuite assemblé soit sur une lamelle de verre, soit à une cavité en PDMS, soit directement

au vrai dispositif transducteur, selon l'expérience à réaliser. L'assemblage entre le PDMS et le support choisi est réalisé en exposant chacune des surfaces à assembler à un plasma oxygène pendant 2min. Le plasma oxygène a pour but de créer un couplage covalent entre les deux faces induisant ainsi un scellement hermétique lorsqu'elles sont mises en contact. Avant l'assemblage, les puits de chargement sont ouverts dans le PDMS grâce à des emporte-pièces cylindriques.

D. Caractérisations morphologiques

Les dimensions des canaux et l'état de surface de chaque circuit est vérifié au profilomètre et au MEB. La Figure 93 (a,b,c) regroupe les clichés MEB d'un circuit en PDMS obtenu selon les étapes et paramètres optimaux décrits précédemment. La Figure 93 (d) montre les défauts de surface obtenus dans le cas d'une impression 3D du moule primaire incliné à 30°, un des paramètres qui avait été testé pour la mise au point du procédé de fabrication mais qui n'a pas été retenu. On voit en effet nettement sur cette image les paliers dus à la succession de polymérisation de la résine voxel par voxel, créant une rugosité atteignant une dizaine de microns qui perturberait l'écoulement des fluides prédit par les simulations.

Des irrégularités sont également observées sur les faces de la pyramide (a,b) ainsi que sur les parois des canaux (c). Cette rugosité de surface est de l'ordre de 2 μ m. Lors de la descente du fluide au fond du puits, ces variations de hauteur pourraient avoir une influence et perturber l'écoulement. Néanmoins, la hauteur du canal traversé étant de 100 μ m, et le fluide confiné étant en contact avec les parois du silicium et non celle de la pyramide du circuit en PDMS, nous nous attendons à ce que l'effet de cette rugosité devienne négligeable sur l'écoulement fluide. De plus cette variation n'est pas assez importante devant les dimensions des canaux pour perturber l'écoulement au point de créer des turbulences, nous restons dans un régime d'écoulement laminaire. Les mêmes présomptions ont été faites concernant les irrégularités des parois des canaux. Qui plus est, le fluide confiné étant entouré par le fluide extérieur de gaine, il devrait être protégé d'une éventuelle variation par rapport au modèle lié à cet état de surface.

Une fois ces conjectures acceptées sur l'influence négligeable de la rugosité de surface, les observations MEB accompagnées de mesure au profilomètre permettent essentiellement de valider la reproduction conforme de la géométrie et des dimensions du circuit par rapport au design et au moule initial, malgré la succession de deux moules intermédiaires lors des étapes de fabrication.

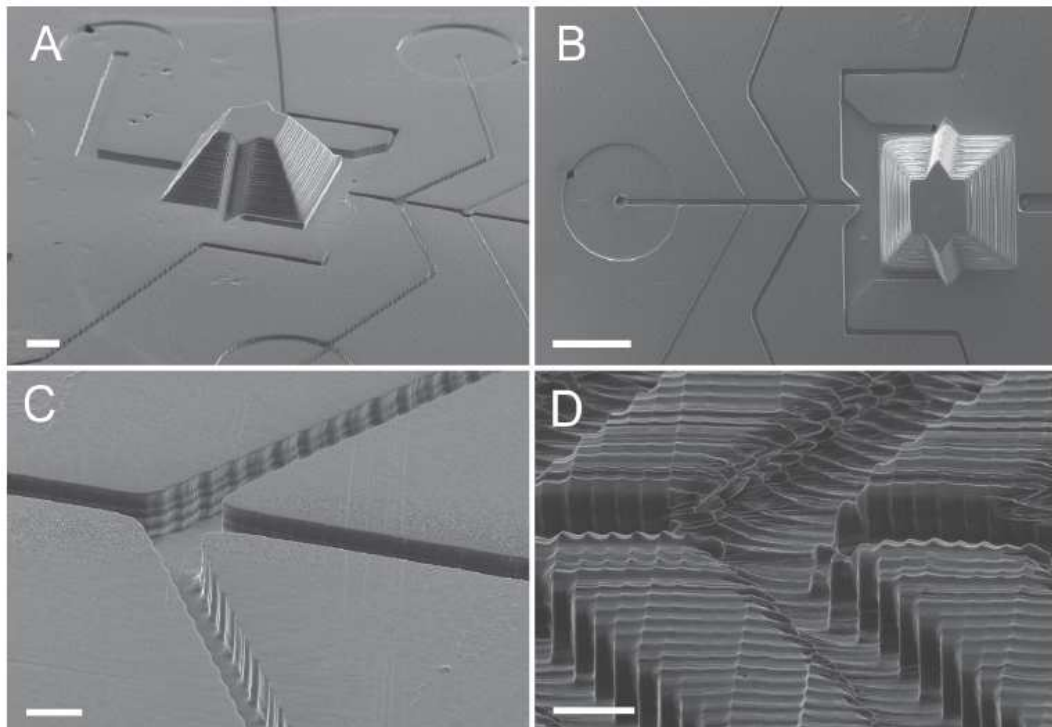


Figure 93 Clichés MEB du circuit en PDMS obtenu. (A) Vue d'ensemble et (B) vue de dessus du circuit laissant voir la pyramide et ses ailettes latérales ainsi que l'ensemble des canaux. Les cercles aux extrémités des canaux ont été rajoutés comme repères visuels pour faciliter l'ouverture des puits de chargement dans le PDMS. (C) Vue de l'intersection des canaux assurant le confinement fluide. L'état de surface du dessus du circuit apparaît lisse et plan. Les parois verticales des canaux révèlent une certaine rugosité. L'image (D) montre la même jonction pour un circuit en PDMS obtenu via un moule primaire imprimé avec un angle de 30° dans l'imprimante 3D. Ce paramètre testé induit une importante rugosité de surface, et n'a, par conséquent, pas été retenu.

Une fois les étapes de fabrication validées, les circuits microfluidiques en PDMS sont assemblés successivement à différents supports :

- En premier lieu à une lamelle de verre pour bénéficier de sa transparence et permettre la vérification du confinement en amont du puits au niveau de la jonction. Dans ce cas la pyramide du circuit est tronquée (en réalité grâce à la facilité et rapidité du procédé mis en place, un nouveau circuit identique au circuit final, mais ne comportant pas de pyramide, est conçu et fabriqué selon les étapes décrites précédemment).
- En second lieu à un morceau de PDMS présentant une cavité identique à celle de la cavité de la membrane de nitrure. Là aussi l'intérêt est de tirer profit de la transparence du PDMS pour observer et valider le confinement du fluide en amont, lors de la descente le long des parois de la pyramide et au fond du puits en contact avec la membrane.
- Enfin, une fois le confinement validé aux étapes précédentes, à la partie supérieure du dispositif, c'est-à-dire à un échantillon de silicium gravé débouchant sur la membrane de nitrure.

Une photographie du circuit microfluidique final assemblé à la membrane de nitrure est donnée Figure 94.

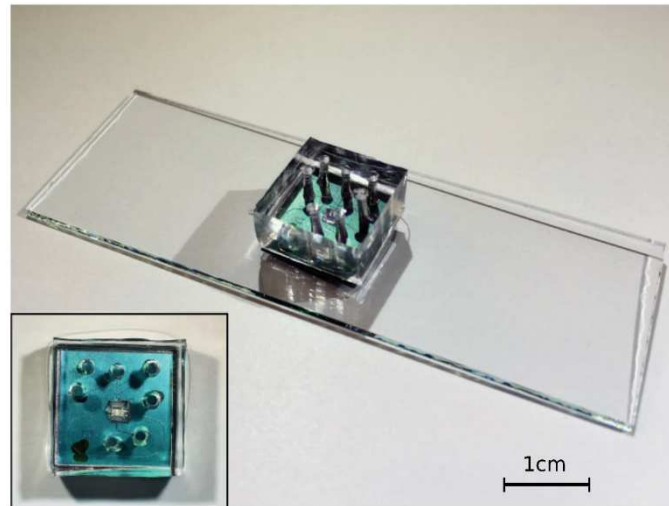


Figure 94 Photographie de la plateforme finale neurone artificiel en PDMS assemblée à une membrane de nitrure de silicium posée sur une lame de verre. Vue de dessus en encart.

E. Caractérisation fonctionnelle

➤ Montage expérimental

Pour visualiser et caractériser l'écoulement des fluides dans les circuits microfluidiques, une technique très répandue est d'utiliser la microscopie de fluorescence [204][206][211].

Les circuits microfluidiques à analyser sont placés sur un porte-échantillon, et un marqueur fluorescent, la fluorescéine, est incorporée au fluide central à caractériser. L'ensemble est éclairé par une lampe UV, et un kit de filtres est ajouté au montage afin de ne collecter que la lumière émise par le liquide fluorescent. Un filtre d'excitation et un filtre d'émission, ayant une plage de longueur d'onde qui ne se recoupe pas sont utilisés avec un miroir dichroïque qui réfléchit la lumière d'excitation et transmet la lumière d'émission. La lumière est collectée par un objectif x5. La concentration des marqueurs sont à corrélérer avec l'intensité de la lumière détectée. La limite de détection de la fluorescéine étant de quelques pM [212], cela nous permet de l'utiliser en très faible quantité pour ne pas risquer de perturber l'écoulement des fluides avec l'ajout d'une espèce en solution.

Les micro-canaux à l'intérieur de la puce microfluidique sont reliés à l'extérieur par des puits de chargement percés à travers le PDMS. Ces puits d'entrée et de sortie sont reliés par des tubes à des pompes pousse-seringue qui permettent de contrôler précisément et individuellement le débit des fluides injectés puis évacués.

➤ Confinement microfluidique

Rappelons que l'objectif du circuit microfluidique développé est d'amener un fluide confiné sur une dizaine de microns de large au contact de la membrane en SiN au fond du puits de gravure du dispositif. Afin de caractériser et de valider cet outil mis au point, la démarche de caractérisation fonctionnelle suivie consiste à valider séparément chaque partie du circuit :

- i. Tout d'abord, il faut vérifier que la première jonction hydrodynamique en amont de la cavité assure correctement le confinement du fluide central voulu. Le dispositif étant opaque (silicium) excepté sur la zone de la membrane de nitrure, la puce microfluidique en PDMS est assemblée pour valider cette étape à une lame de verre transparente qui permet de visualiser

ce qui se passe au niveau de la jonction en amont de la membrane. La pyramide du circuit est alors tronquée.

- ii. Ensuite, de manière à suivre l'écoulement et vérifier son comportement lors de la descente le long des parois de la pyramide et plus loin sous sa base, un support en PMDS a été créé reproduisant la forme et les dimensions exactes d'une cavité de membrane de SiN. Le circuit microfluidique est alors interfacé à ce socle transparent en PDMS, nous permettant de suivre le comportement des fluides et de déterminer les paramètres optimaux de l'écoulement assurant le meilleur confinement au fond de la cavité.
- iii. Enfin, une fois ces deux étapes validées, le circuit est interfacé à la membrane SiN du dispositif afin de confronter le comportement et les paramètres d'écoulement trouvés précédemment aux conditions réelles.

Nous avons commencé par l'étape de validation (i). Une image du meilleur confinement obtenu sur la partie du circuit constituée de la jonction hydrodynamique est présentée Figure 95. Les paramètres associés sont résumés dans le Tableau 10 regroupant les valeurs de débit de chaque canal microfluidique issus de la simulation.

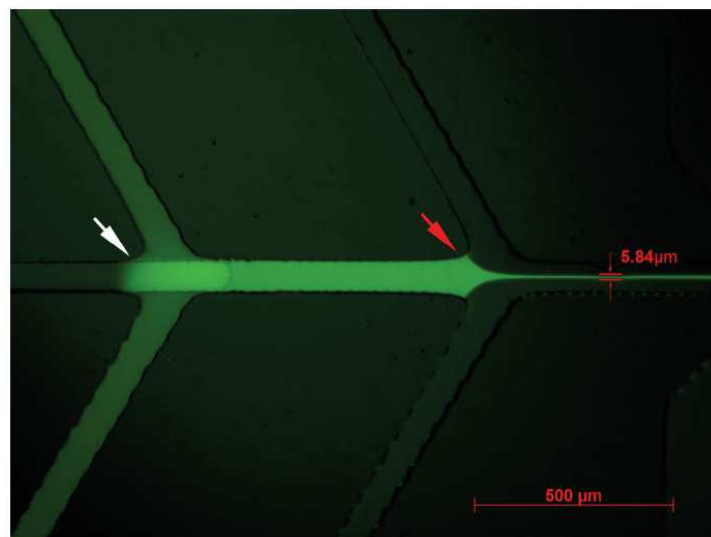


Figure 95 Image de la jonction hydrodynamique obtenue par microscopie de fluorescence, pour un circuit assemblé sur une lame de verre. Un marqueur fluorescent, de la fluoescéine, a été rajouté au fluide cible. Celui-ci est injecté par les canaux latéraux et confiné verticalement au niveau de la flèche blanche, puis latéralement au niveau de la flèche rouge. Le fluide fluorescent après la deuxième intersection révèle une largeur à mi-hauteur de $5,84\mu\text{m}$. Les mesures ont été faites après traitement avec le logiciel image J, après retrait du bruit de fond et tracé du profil d'intensité. La valeur de confinement donné est la largeur à mi-hauteur de ce profil.

Le fluide cible en sortie de la jonction hydrodynamique auquel on a rajouté de la fluoescéine est bien confiné par le fluide extérieur introduit par le canal central d'abord et par les canaux latéraux ensuite. La largeur du confinement obtenu est de $5,84\mu\text{m}$. Ce résultat en amont de la membrane est en adéquation avec l'objectif visé (la taille caractéristique d'un neurone est de $10\mu\text{m}$) et il est même légèrement meilleur que ce qui a pu être prédit par les simulations. (La plus petite largeur obtenue avec les simulations était de $17,6\mu\text{m}$). Ceci s'explique en partie par le découpage en éléments finis choisi pour résoudre le modèle. En effet malgré un découpage que nous avons densifié au niveau de la jonction pour une résolution optimale, il est possible que ce découpage extrapole en partie le profil de concentration le faisant apparaître plus diffus.

Cette première étape permet de valider le fonctionnement attendu de la jonction hydrodynamique de notre circuit microfluidique, qui affiche de surcroît des performances très prometteuses. De ce fait,

nous nous sommes alors intéressés à la deuxième étape de validation du circuit en l'interfaçant à un socle en PDMS reproduisant la forme complémentaire de la pyramide. Le résultat obtenu en injectant les fluides est donné Figure 96.

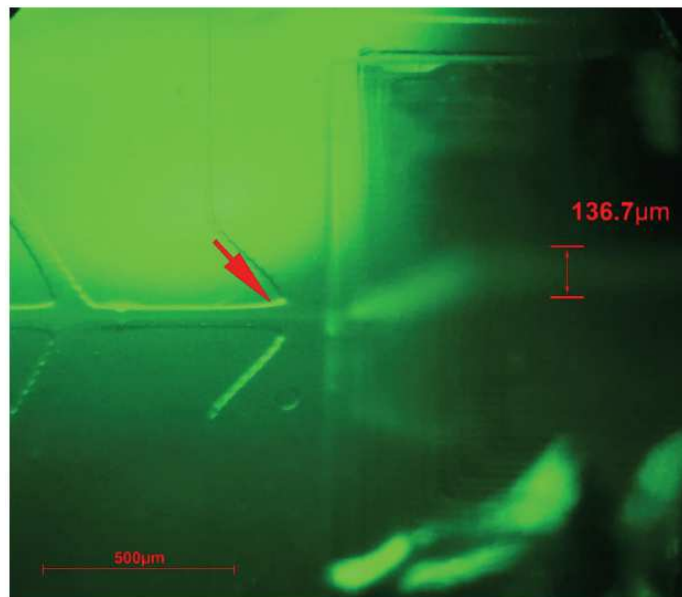


Figure 96 Image du circuit microfluidique au niveau de la traversée de la pyramide, obtenue par microscopie de fluorescence pour un circuit assemblé à un support en PDMS. Le fluide cible coloré par de la fluorescéine est confiné après la jonction indiquée par la flèche rouge. Une diffusion a clairement lieu à son arrivée au fond du puits ne maintenant pas le confinement initial, le fluide fluorescent affichant une largeur de $136,7\mu\text{m}$.

Nous constatons tout d'abord que le confinement du fluide est assuré en sortie de la jonction avant la traversée du puits (flèche rouge). En revanche, le confinement obtenu en sortie de jonction, lorsque l'écoulement descend le long de la paroi de la pyramide est bien moins conforme aux résultats attendus. Nous mesurons ici une largeur du fluide fluorescent de $136,7\mu\text{m}\pm 20\mu\text{m}$, difficilement assimilable à un confinement.

Premièrement, il est à noter que la qualité de l'image est nettement diminuée pour cette expérience en raison notamment d'une importante diffusion de la lumière à son passage à travers le PDMS. En effet si l'on compare avec l'expérience précédente, le fluide confiné auquel de la fluorescéine a été incorporée était directement au contact d'une lamelle de verre, et la fluorescence émise ne traversait que cette lamelle. Ici, le socle en PDMS auquel est interfacé le circuit a une épaisseur de quelques mm (il faut inclure au minimum la hauteur de la pyramide de $725\mu\text{m}$) au travers desquels la lumière diffuse beaucoup. De plus, il devient compliqué de faire la focalisation de l'image, la jonction hydrodynamique et le fond du puits n'étant pas à la même hauteur. Ces précisions expliquent en premier lieu le mauvais contraste de fluorescence sur l'ensemble de la mesure ainsi que sa grande incertitude.

Par ailleurs, les étapes successives de fabrication du circuit et du socle en PDMS induisent très certainement des variations de géométries qui expliquent ces écarts aussi importants au modèle. L'état de surface et notamment sa rugosité sont suspectés d'avoir une influence dans ce cas-ci, alors qu'ils étaient négligeables dans l'expérience précédente. En effet, nous avons vu lors de la fabrication des circuits que ses flancs présentaient une certaine rugosité de surface (quelques μm). Or nous avons émis l'hypothèse que cet état de surface n'influencerait pas le confinement du fluide cible car ce dernier n'était pas en contact direct avec les parois. Cette hypothèse s'est vérifiée dans l'expérience précédente pour laquelle le fluide cible est en contact latéral avec le fluide gaine et repose sur la lamelle de verre. A l'inverse, dans cette configuration-ci, le fluide est en contact en dessous avec le

socle en PDMS, lui-même moulé à partir d'une pièce imprimée en impression 3D via les étapes intermédiaires présentées en amont. Or nous avons vu sur les clichés MEB de vérification (Figure 93) que l'état de surface sur les plans horizontaux étaient de bonne qualité, alors que des irrégularités et des marches étaient visibles sur les parois des canaux et sur les flancs de la pyramide. Nous suspectons ces défauts de fabrications inhérents à la méthode choisie d'être en partie responsables de la perturbation du confinement du fluide cible au passage de la pyramide inversée du socle en PDMS.

Enfin, une des étapes critiques de la préparation des échantillons à étudier est l'assemblage du circuit microfluidique à son support. Il faut en effet aligner correctement la pyramide et son puits complémentaire. Cet alignement se faisant à la main sous un microscope, il est difficile d'assurer un positionnement au μm près. De plus, nous avons vu que pour assurer une bonne étanchéité entre les couches de PDMS, le scellement de ces deux pièces se fait en créant des liaisons pendantes sur chacune des surfaces du PDMS par un traitement à base de plasma d'oxygène, induisant des liaisons covalentes irréversibles à leur contact. Il devient par conséquent impossible de déplacer ou de replacer un circuit sur son support s'il a été initialement mal positionné.

Pour optimiser cette étape, des croix d'alignement pourraient être rajoutées au dessin des circuits afin d'en faciliter le positionnement. Une autre alternative pourrait être de changer le processus de scellement, afin de permettre de régler la position relative des deux pièces correctement avant scellement définitif. Faute de temps, ces alternatives n'ont pu être explorées.

Le résultat de cette deuxième étape de caractérisation n'étant pas conforme aux attentes initiales, nous n'avons pas pu déterminer les paramètres optimaux de débits à injecter pour un confinement acceptable du fluide cible à la base de la pyramide. Compte tenu des hypothèses émises quant aux causes de ce dysfonctionnement, il pourrait être envisagé pour la suite de ce projet de s'orienter malgré tout vers la troisième étape en interfaçant le circuit directement à la membrane du dispositif. En effet si l'on considère que la cause principale de la perturbation de l'écoulement au passage de la pyramide est l'irrégularité de surface des flancs du socle de PDMS fabriqué pour cette validation, alors ce problème devrait s'estomper dans la configuration réelle, la rugosité de surface des parois de la cavité de silicium étant bien moindre devant celle induite par les paliers de l'impression 3D. Cependant, cette dernière étape sans les paramètres obtenus précédemment est rendue très délicate à cause de l'opacité du silicium en amont de la membrane. Les paramètres auraient été réglés à l'aveugle sans suivi possible de l'écoulement. Étant arrivés à la limite du temps imparti pour ce projet, ce test n'a pas pu être mené ici, mais constitue une des pistes et difficultés envisageable à contourner pour la suite, afin d'aboutir au fonctionnement complet de la puce micro fluidique développée et permettre la caractérisation complète du dispositif.

Conclusion de la partie II

Dans cette partie, nous avons présenté une approche originale basée sur le concept de concentration de flux que nous avons explorée afin de tenter d'évaluer, en l'absence de neurones biologiques les caractéristiques de détection du dispositif électro-optique. Nous avons d'abord présenté le concept général de la plateforme microfluidique imaginée, qui, basée sur la technique de confinement microfluidique viendrait créer un canal localisé au contact de la membrane. L'application d'un signal électrique approprié dans ce canal d'écoulement fluide viendrait simuler le comportement électrique d'un neurone. Le design général de cet outil répondant à toutes les exigences et contraintes de dimensionnements requises pour lequel nous avons opté a été détaillé. Des simulations basées sur la méthode des éléments finis ont ensuite été menées afin d'optimiser la

géométrie de la puce microfluidique ainsi que les paramètres de l'écoulement menant au meilleur confinement du fluide représentant le neurone.

Sur la base de cette étude préliminaire, la fabrication de la puce microfluidique finale en PDMS a été entreprise, en utilisant des moulages successifs à partir d'un moule maître créé par impression 3D, procédé rapide et reproductible, permettant de tester facilement plusieurs géométries.

Enfin, les premiers tests visant à valider le fonctionnement du circuit microfluidique élaboré ont été présentés. Le fonctionnement de la jonction hydrodynamique a été observé avec succès, révélant un confinement du canal central de $5,84\mu\text{m}$. En revanche, des développements supplémentaires seront nécessaires pour réussir à maintenir ce confinement jusqu'au fond du puits, en contact avec la membrane. Cette partie novatrice du circuit (la partie pyramidale) n'ayant pas fourni les résultats attendus prédits par les simulations. Des éléments et tests supplémentaires envisageables pour la suite de ce projet et susceptibles d'améliorer la performance de la puce microfluidique ont été suggérés et discutés. Ces étapes de perfectionnement supplémentaires devraient à terme permettre d'aboutir à une plateforme micro fluidique fonctionnelle, capable de simuler le comportement électrique localisé d'un neurone afin de déterminer les caractéristiques complètes de détection du dispositif électro-optique.

III. Vers le couplage du dispositif avec les cellules neuronales

Les travaux effectués au cours de ce projet de thèse visaient à mettre au point un dispositif et à obtenir expérimentalement la preuve du concept avancé. Aussi, en parallèle des expérimentations amorcées dans la partie précédente visant à caractériser au mieux le prototype développé et ses performances physiques, un couplage avec des cellules neuronales a été envisagé dès le début du projet, dont l'objectif final est la visualisation de l'activité électrique réelle des neurones grâce au transducteur.

La validation du concept du dispositif par les cellules neuronales biologiques repose sur plusieurs étapes :

- i. La vérification de la compatibilité du dispositif avec les neurones. Il faut en effet maintenir les cellules en culture pendant une durée de 7 à 14 jours, période nécessaire pour qu'elles atteignent leur maturité et développent des connexions leur permettant d'établir une activité au sein du réseau. Pour cela, la viabilité des cultures neuronales sur la membrane de nitrure de silicium avec laquelle ils seront en contact doit être évaluée.
- ii. L'enregistrement de l'activité neuronale effective : pour cela il faut visualiser l'activité spontanée ou induite de quelques cellules. Puisqu'on ne s'intéresse pas dans cette phase préliminaire à l'intégralité du réseau mais à une poignée de cellules seulement, les mesures sont compatibles avec le banc expérimental développé précédemment qui récolte les variations d'intensité optiques via la caméra d'un microscope dont le champ d'observation est suffisant pour ces quelques cellules.
- iii. La validation de la mesure en la couplant simultanément à une méthode existante d'enregistrement de l'activité neuronale in vitro comme le *patch clamp* ou l'imagerie calcique pour s'assurer du phénomène mesuré.

- iv. L'enregistrement de l'activité sur l'ensemble d'un réseau fonctionnel, de type puce compartimentée de Taylor (voir chapitre 1). Pour cette étape ultime qui requiert la visualisation de l'ensemble d'un réseau complexe de neurones, le développement d'une plateforme adaptée intégrant tous les éléments d'optiques nécessaires dont un capteur large champ interfacé directement au dispositif électro-optique a été entreprise dans le cadre d'un nouveau projet de thèse.

Tous les aspects du projet liés aux neurones biologiques ont d'abord été développés au sein de notre laboratoire et des plateformes scientifiques environnantes. Nous avons d'abord été accueillis dans un laboratoire du CEA pour l'animalerie et la salle de culture cellulaire, ce qui m'a permis de me former à l'extraction et à la culture de cellules neuronales. Puis la majorité des campagnes de culture neuronales ont été effectuées entre Clinatéc (pour l'animalerie et l'extraction des embryons), et la plateforme NanoBioTech du CIME (pour la culture cellulaire, la microscopie et les mesures), où nous avons entièrement développé notre propre plateforme de culture cellulaire. Tout le long du projet une étroite collaboration a été entretenue avec l'équipe « Dynamiques intracellulaires et neurodégénérescence » de L'institut des Neurosciences de Grenoble (GIN). Les dernières campagnes de culture de neurones ont été effectuées au sein de leur plateforme.

A. Culture de neurones primaires d'hippocampe

Compte tenu du contexte et de la visée du projet, dont l'objectif à terme est d'accéder à l'activité fonctionnelle de réseaux de neurones *in vitro* complexes et de modéliser des circuits et des comportements *in vivo*, nous avons fait le choix d'adopter pour nos cultures des cellules primaires de cerveau. Ce type de culture consiste à prélever les cellules directement sur un organisme pluricellulaire et à les faire pousser *in vitro*. Les cellules primaires se différencient des cellules dites de lignées, l'autre catégorie de cellules utilisées en culture cellulaire. Les lignées cellulaires sont des cellules devenues immortelles soit parce qu'elles sont cancéreuses, soit parce qu'elles ont été modifiées génétiquement par l'ajout d'un gène de virus codant pour une protéine les rendant immortelles (le virus SV40 par exemple). Ces cellules sont beaucoup plus faciles à cultiver que les cellules primaires, car elles échappent au phénomène de sénescence, se divisent et s'adaptent bien aux conditions de culture. En revanche, elles ont un métabolisme qui peut être très éloigné de leurs homologues originales *in vivo*, par conséquent non adaptées à nos applications.

A contrario, les cellules primaires sont plus sensibles à leur environnement et plus délicates à maintenir en culture, notamment parce que les cellules adultes ne se divisent pas, mais reflètent bien mieux le métabolisme et le comportement de leurs organes d'origine [213].

➤ Choix des neurones

Les neurones primaires majoritairement utilisés en neuroscience pour les cultures *in vitro* sont des neurones d'embryon de rongeur, issus du cortex (neurones corticaux), de l'hippocampe (neurones hippocampaux) ou encore du striatum (neurones striataux) selon les études visées. Dans notre cas nous avons utilisé des neurones d'hippocampe issus d'embryon de rat pour plusieurs raisons :

- (i) Le rat est considéré comme étant le modèle le mieux adapté pour les études du fonctionnement du cerveau car c'est le meilleur compromis entre accessibilité, pertinence par rapport au cerveau humain, et éthique [214].
- (ii) Le stade embryonnaire garanti une bonne capacité d'adaptation des jeunes cellules aux contraintes des environnements *in vitro* [213].

- (iii) Quant à l'hippocampe, c'est une structure du cerveau dont le développement des cellules in vitro est bien maîtrisé : les tissus dissociés d'hippocampe fournissent une population homogène de neurones, composée essentiellement de neurones pyramidaux dont les neurites (prolongements cellulaires) créent beaucoup de connexions synaptiques indispensables à l'activité du réseau [215].

L'hippocampe présente également peu de cellules gliales [216]. Pour rappel les cellules gliales ou glies sont des cellules du cerveau qui supportent mécaniquement les neurones et leur architecture, isolent électriquement les neurones entre eux, assurent leur apport en nutriments et façonnent le système immunitaire du cerveau [7][8][9][217]. Bien que les cellules gliales jouent un rôle important dans le développement des connexions inter neuronales (i.e. les synapses), elles ne sont pas directement impliquées dans les interactions synaptiques et la signalisation électrique des neurones [218][219][220]. La faible proportion naturelle de cellules gliales par rapport aux neurones dans l'hippocampe en fait une région d'intérêt lorsque l'on s'intéresse à l'activité de la population.

Par ailleurs, d'un point de vue cognitif, l'hippocampe est une région du cerveau responsable de la mémoire spatiale et de la navigation [3][221][222], de la mémoire à long terme [4], et de l'apprentissage [5]. Il a été montré que les principales maladies neurodégénératives étaient à relier, entre autres, à un dysfonctionnement de l'hippocampe. C'est le cas pour la maladie d'Alzheimer par exemple, où la dégénérescence de cellules hippocampales est à l'origine de symptômes tels que la perte de mémoire ou la désorientation, caractéristiques de la maladie [6][223]. L'hippocampe est également impliqué dans des dysfonctionnements liés à la maladie de Parkinson [224], et celle d'Huntington [225]. Compte tenu de la diversité et de la complexité de ses fonctions, les neurones issus de cette région développent en culture in vitro des réseaux complexes présentant une forte activité électrique, adaptés à terme à l'étude et à la compréhension partielle, parmi d'autres affections cérébrales, de maladies neurodégénératives telles que Alzheimer, Parkinson et Huntington comme il est question dans le contexte élargi de ce projet.

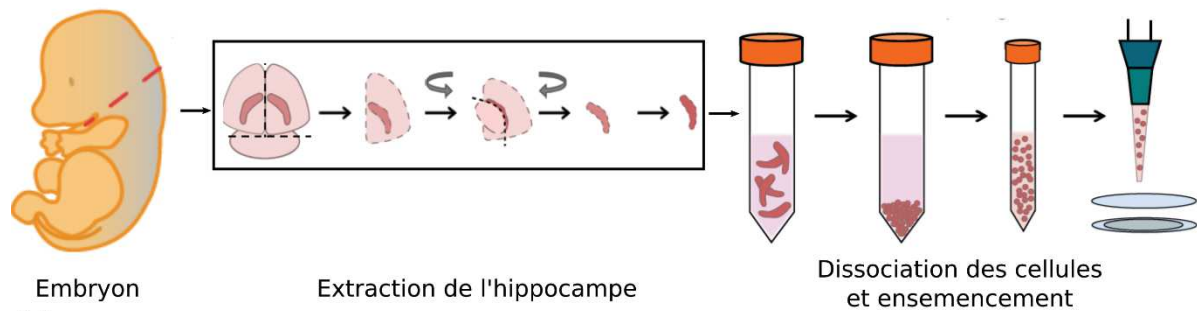
➤ Extraction des neurones

Pour nos cultures neuronales, nous utilisons des embryons de ratte OFA de chez Charles Rivers à 18 jours de gestation (E18). Cela correspond aux derniers jours précédents la naissance, la gestation d'une ratte étant de 21 jours en moyenne. La ratte gestante est sacrifiée par rupture des cervicales après endormissement de l'animal. Un outil est appliqué à la base de la tête pour la maintenir pendant que la queue est tirée vers l'arrière. Les embryons sont ensuite prélevés et sortis un par un de leur poche amniotique. Le cerveau est extrait de l'embryon, après incision et ouverture de la boîte crânienne encore souple à ce stade de développement.

L'hippocampe est la région du cerveau se situant dans le lobe temporal de chacun des deux hémisphères. Pour l'isoler du reste du cerveau, la première étape consiste à ouvrir et séparer les deux lobes de chaque hémisphère. Sous un microscope optique et grâce à des pinces fines de chirurgie dédiées, l'enveloppe de méninges recouvrant le cerveau irrigué par de nombreux vaisseaux sanguins et contenant le liquide cérébro-spinal est délicatement retirée. L'hippocampe est ensuite disséqué et prélevé sur chacun des deux hémisphères en découpant avec les pinces tout autour. Une étape supplémentaire peut parfois être nécessaire pour « nettoyer » correctement la structure extraite si

elle n'a pas été découpée assez finement dans son hémisphère. Chaque hippocampe fournit environ 1million de cellules. Les étapes de ce protocole d'extraction sont schématisées Figure 97.

(a)



(b)

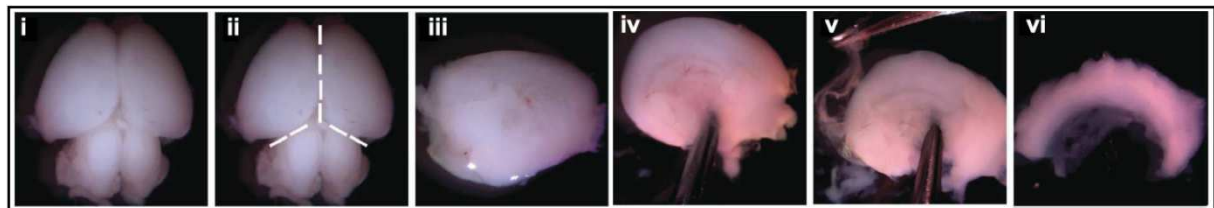


Figure 97 Mise en culture de neurones primaires d'hippocampe. (a) Etapes schématisant l'extraction et la dissection des hippocampes, la dissociation des neurones et leur resuspension à la concentration désirée, et l'ensemencement sur les substrats de culture. (b) Images par microscopie optique détaillant l'étape de dissection de l'hippocampe. (i) le cerveau est placé de façon à ce que sa face dorsale soit vers le haut. (ii)-(iii) Les deux hémisphères sont ouverts et peuvent être séparés. (iv)-(v) L'hémisphère est maintenu à l'aide d'une première pince, pendant qu'une deuxième retire l'enveloppe extérieure (les méninges) et dégage correctement l'hippocampe. (vi) L'hippocampe est extrait en découpant tout autour avec une pince. Adapté de [226].

➤ Dissociation et mise en culture

Les étapes de la dissociation sont résumées Figure 97 (a). Les hippocampes extraits sont placés dans une solution tampon (10mM HEPES buffered HBSS) au pH et à la salinité physiologique permettant de les garder le temps de la chirurgie, et si nécessaire de les transporter dans ce bain neutre, plongé dans de la glace, jusqu'à la salle de culture. Les hippocampes sont ensuite pipetés et transférés dans une solution de dissociation composée d'EDTA (50mM, Life Technologies), de L-cystéine (Sigma Aldrich) et de Papain (Sigma Aldrich). Les structures sont dissociées chimiquement par cette solution contenant une enzyme de digestion (papain) pendant 40min au bain marie à 37°C, en homogénéisant régulièrement la solution afin de favoriser la dissociation des cellules. Les neurones partiellement dissociés sont ensuite nettoyés par 3 rinçages successifs dans un milieu Neurobasal (Thermofischer), et enfin placés dans leur milieu de culture final composé de Neurobasal additionné de B27 (Life Technologies) et de L-glutamate (Sigma-Aldrich), des suppléments de nutriments, ainsi que d'un mélange de pénicilline et streptomycine (1 :100), des antibiotiques (Life Technologies).

Ce milieu de culture contient tous les éléments nécessaires pour garder les cellules en culture à long terme. Les cellules sont ensuite doucement triturées à l'aide d'une pipette, de manière à finir la dissociation mécaniquement et à les homogénéiser. Une faible quantité de cette suspension est prélevée afin de compter les cellules, puis la suspension est diluée à la concentration désirée pour l'ensemencement. Pour réaliser cette dernière étape, les cellules sont déposées par sédimentation sur leur substrat de culture et placées à l'incubateur porté à 37°C et régulé à 5% de CO₂. Elles sont gardées dans ces conditions le temps nécessaire à l'étude désirée, et le milieu de culture est changé tous les 2 à 3 jours pour renouveler l'apport en nutriment.

➤ Préparation des substrats

Les cellules ne s'attachent pas automatiquement à la surface des substrats, et ce même pour les matériaux utilisés traditionnellement pour les cultures neuronales comme les lamelles de verre ou les boîtes de pétri. Pour pallier à ce problème, les surfaces doivent être fonctionnalisées avec un polymère d'adhésion [226], dont le mécanisme est bien connu [227]. Nous avons utilisé successivement de la PDL (Poly-D-lysine) et de la laminine pour favoriser l'attachement des cellules au substrat.

La veille de la mise en culture, nos substrats sont rentrés sous une hotte stérile après avoir été pulvérisés à l'éthanol. Pour rappel, les substrats mis en culture sont des lames de verre de microscopie pour les cultures de contrôle et nos dispositifs électro-optiques dont la face supérieure est le carré de silicium dans lequel est centrée la pyramide creusée débouchant sur la membrane de nitrure de silicium. Chacun de ces échantillons est surmonté d'un réservoir en PDMS circulaire de 5 mm de diamètre (lié par plasma O₂ sur les lames de verre, simplement déposé sur les dispositifs) chargé de contenir les neurones en culture. Chaque puits de culture est rempli d'éthanol, puis rincé par 3 lavages consécutifs à l'eau DI et la stérilisation est complétée par une exposition de 45min aux UV. Les puits sont remplis par 50µL d'une solution de PDL à 0,1 mg/mL (volume nécessaire pour recouvrir toute la surface contenue par le puits de culture en PDMS de 5mm de diamètre). Puis les échantillons sont placés dans des boîtes de pétri fermées, au fond desquelles on a pris soin de déposer une feuille de papier absorbant humidifiée de manière à limiter l'évaporation. L'importance de cette étape est discutée plus loin.

Ils sont ensuite placés au réfrigérateur toute la nuit. Avant la chirurgie, les puits de culture sont rincés largement à l'eau DI et remplis d'une solution de 20µg/mL de laminine pendant 2h avant d'être à son tour rincée et remplacée par du milieu de culture à 37°C en attendant l'ensemencement des neurones, à une densité de 2500 ou 3500 cellules/mm².

B. Maintien des cultures à long terme

Pendant le développement de notre plateforme de culture cellulaire et la prise en main et l'adaptation du protocole à nos applications, nous avons rencontré une série de problèmes qui se matérialisaient par la mort des neurones avant qu'ils aient pu atteindre leur maturité. Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, cultiver des neurones primaires est très délicat car beaucoup de paramètres rentrent en jeu. Nous avons pu néanmoins identifier certaines causes provoquant ces morts cellulaires et ayant rendu les premières campagnes de culture inexploitable pour déboucher progressivement sur des cultures pérennes et en bonne santé.

➤ La fonctionnalisation de surface

Un des problèmes que nous avons rencontrés d'emblée était la mort prématurée des cellules suite à la formation d'importants agrégats (un exemple typique des agrégats obtenus est donné Figure 98(b)).

Le développement attendu d'une population de neurones *in vitro* est montré donné Figure 98 (a) : les neurones dissociés sont déposés sur le substrat correctement fonctionnalisé à DIV0. Ils attachent, commencent à migrer et développent quelques neurites (prolongements cellulaires) dès le lendemain.

Puis le développement se poursuit jusqu'à 7 jours *in vitro* de façon relativement homogène sur toute la surface jusqu'à obtenir un réseau de neurites étendu entre les somas. C'est le stade où les premières connexions se créent et une activité électrique interneurone commence à apparaître [228].

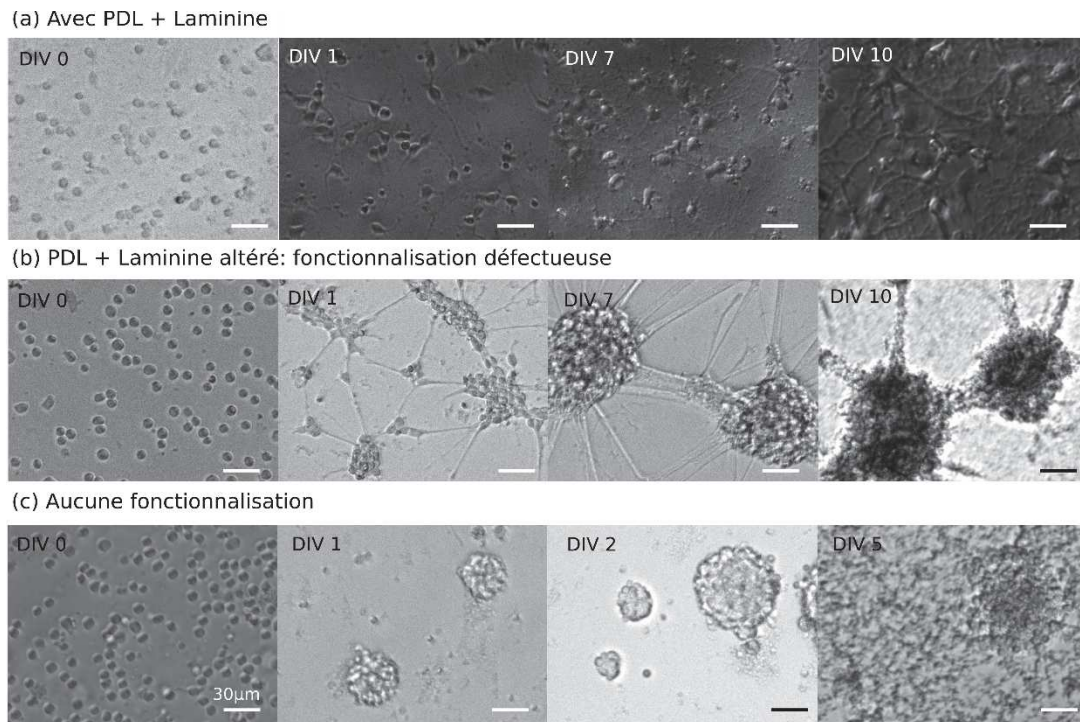


Figure 98 Influence de la fonctionnalisation du substrat sur l'adhésion des neurones. Images de microscopie optique à différents stades de développement illustrant les conséquences sur la morphologie et la survie des cultures des trois cas de figures : (a) Cas d'une fonctionnalisation correcte avec de la PDL et laminine à DIV 0, DIV 1, DIV 7 et DIV 10. (b) Cas typiquement rencontré lors des débuts de nos cultures qui s'est avéré être dû à une altération de la solution de fonctionnalisation. Images prises aux mêmes stades que (a). (c) Culture sans aucune fonctionnalisation de surface à DIV 0, DIV 1, DIV 2 et DIV 5. Les neurones sont issus de la même culture pour les trois cas de figure. Ils sont déposés à DIV 0 sur les substrats en verre à une densité de 2500 cellules/mm² ($5 \cdot 10^4$ cellules dans un réservoir circulaire de PDMS de 5mm de diamètre). Barre d'échelle 30µm.

Puis de DIV7 à DIV 14 le réseau de neurites et de connexions se densifie jusqu'à tapisser toute la surface, et l'activité spontanée au sein du réseau s'intensifie en conséquence jusqu'à atteindre un pic à DIV14 [229],[230]. Les cultures en bonne santé peuvent être ainsi maintenues jusqu'à une trentaine de jours in vitro selon les études menées.

Certaines de nos premières cultures ne survivaient pas au-delà de 5 à 8 jours in vitro, et présentaient le développement caractéristique observé en (b). Les cellules dissociées sont déposées sur le substrat puis commencent à former de petits agglomérats dès le premier jour de culture, qui deviennent de plus en plus importants au bout de 7 jours. Des connexions entre ces regroupements de neurones sont quand même observées. Le réseau cesse de se développer et meurt entre 5 à 10 jours de culture (apparence pointillée caractéristique des cellules mortes en décomposition visible à DIV 10). Ces agglomérats peuvent être dus à divers facteurs comme une mauvaise dissociation des cellules qui implique des amoncellements de cellules dès leur ensemencement mais sont le plus souvent dus à mauvais attachement des cellules à la surface [226].

Pour conforter cette hypothèse, le développement de neurones sans aucun traitement de surface est montré en (c). Dans ce cas, les neurones se regroupent spontanément, évitant au maximum la surface avec laquelle ils n'ont pas d'affinité biochimique. Ils ne se développent pas du tout et finissent par mourir complètement au bout de 3 à 5 jours. Dans notre cas où les cultures présentent des agrégats, les neurones étaient correctement dissociés au moment de l'ensemencement comme l'atteste la photo en (b) à DIV0. Il s'est avéré que le problème venait d'une fonctionnalisation de surface défectueuse. En effet les solutions de PDL et Lamine utilisées étaient à ce moment-là préparées plusieurs semaines voire plusieurs mois à l'avance et stockées à -20°C à la concentration souhaitée

dans des aliquots de faible volume. Or il s'est avéré que ce système de stockage à long terme altérait probablement ces solutions, car en changeant ce paramètre et en ne préparant nos solutions que quelques jours au maximum avant la mise en culture, ce phénomène d'agrégation n'a plus été observé.

➤ Le contrôle de l'humidité

Un autre paramètre important que nous avons pu identifier était le contrôle de l'évaporation des milieux de cultures. En effet nous avons observé à plusieurs reprises des morts cellulaires de culture entière au bout de 4 à 6 jours *in vitro* sans raisons apparentes, et malgré des cultures homogènes sans agglomérats, quelle que soit la densité ou le substrat utilisé. Là aussi les causes pouvaient être multiples, comme des cellules mal ou trop triturées lors de la dissociation, un mauvais rinçage des polymères fonctionnalisant comme la PDL qui peut être cytotoxique si elle est relarguée dans les cellules, etc. Grâce à plusieurs observations croisées, nous avons pu identifier la cause principale de ces morts cellulaires prématurées comme venant d'un mauvais contrôle de l'humidité dans les boîtes de pétri dans lesquelles étaient placés nos substrats, comme mis en évidence par la Figure 99.

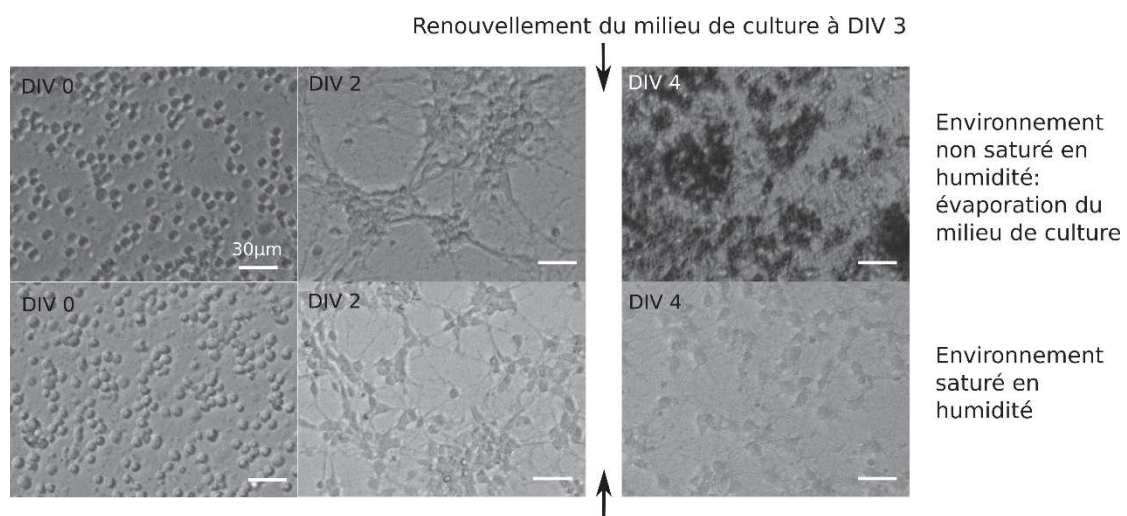


Figure 99 Influence du contrôle de l'humidité dans les chambres de cultures et conséquences sur la morphologie et la survie des réseaux de neurones. Le cas typique rencontré lors de nos premières cultures est donné en (a) à DIV 0, DIV 2 et DIV 4, jour auquel les cellules meurent lorsque l'environnement n'est pas saturé en humidité. (b) Cas d'une culture contrôlée en humidité. Du papier absorbant humidifié à été placé sous la lame de verre dans la boîte de pétri. Les neurones sont issus de la même culture et ensemencés à la même densité de 2500 cellules/mm². Barre d'échelle 30 µm.

Lors de ces cultures qui mourraient systématiquement au bout de 4 à 5 jours *in vitro* les substrats étaient placés directement dans des boîtes de pétri, sans réservoir d'eau ou papier humidifié et les boîtes elles-mêmes placées dans l'incubateur. On observait alors une diminution importante du niveau de liquide dans les puits de culture par évaporation, à laquelle on remédiait en les remplissant par du nouveau milieu de culture à DIV3 (comme décrit précédemment dans les étapes de la culture cellulaire, le milieu de culture doit être changé tous les 2 à 3 jours pour renouveler l'apport en nutriments, le premier renouvellement est effectué à DIV 3). On observe alors une mort systématique des cellules à DIV 4 ou 5 comme le montre la Figure 99. L

l'hypothèse émise est que l'évaporation de l'eau dans les puits de cultures a pour effet de concentrer tous les ions, sels et nutriment présents dans la solution. L'ajout de milieu de culture frais augmente alors considérablement la concentration de ces éléments et devient incompatible voire toxique avec la physiologie des cellules et entraîne leur mort. Nous avons vérifié cette hypothèse en limitant l'évaporation du liquide neuronal dans lequel sont baignés les cellules par ajout d'une feuille de papier absorbant (papier *Whatman*®) humidifié au fond des boîtes de pétri. Cette étape a pour rôle de saturer l'environnement direct en humidité et ainsi limiter l'évaporation du milieu de culture. Notons Figure

99 (b) que les neurones sont toujours vivants à DIV4 après le renouvellement et le réseau continue à se développer correctement. Des cultures ont alors pu être gardées en bon état jusqu'à DIV21 dans ces conditions : c'est le cas de cette même culture dont les stades de développement avancés sont donnés à titre indicatif Figure 100. Des cultures de contrôle ont été effectuées pour lesquelles aucun remplissage intermédiaire des puits par du milieu de culture frais n'a été effectué. Dans ce cas les cellules meurent lentement au bout de 5 à 7 jours par assèchement total dans le cas où l'évaporation n'est pas contrôlée, et au bout de 7 à 10 jours par manque de nutriments nécessaires à leur développement dans le cas où l'évaporation est limitée.

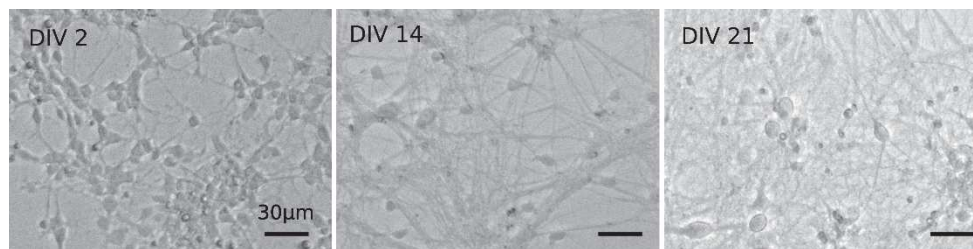


Figure 100. Neurones après 2, 14 et 21 jours de culture *in vitro* sous environnement humidifié. Les images correspondent à la suite des stades de développement de l'échantillon de la culture Figure 99(b). Densité 2500 cellules/mm². Barre d'échelle 30µm.

En conclusion de cette partie, nous avons réussi à successivement identifier ces deux paramètres comme les principaux responsables du mauvais état de nos premières cultures qui ne nous permettait pas de passer aux étapes d'études suivantes. D'autres variables ont également pu influencer ponctuellement l'état de nos cultures, comme par exemple des contaminations par des bactéries. Aucun contrôle total ne peut cependant être exercé sur ces paramètres extérieurs, mais de bonnes pratiques et une vigilance accrue avec la stérilisation, la manipulation des outils sous la hotte et un nettoyage minutieux et régulier des équipements peuvent les limiter.

C. Viabilité des neurones sur le nitrure de silicium

Les cultures neuronales sont traditionnellement effectuées sur des lames de verre ou dans des boîtes de pétri (plastique) car ces matériaux sont biocompatibles et transparents, permettant l'observation des cultures cellulaires. Interfacer les neurones à notre dispositif électro-optique afin de sonder leur activité électrique implique d'effectuer les cultures directement sur la membrane de nitrure de silicium contenant les cristaux liquides fonctionnels sous-jacents.

L'émergence ces dernières années de systèmes intégrés et capteurs en tout genre cherchant à sonder le monde du vivant a vu l'évaluation de nombreux matériaux issus de la microélectronique et de l'industrie du silicium dont le SiN comme potentiels interfaces biologiques. La biocompatibilité du SiN a été révélée pour la première fois en 1999 par des études de cytotoxicité sur des cellules de lignée humaine [231]. Bien qu'il n'existe pas à notre connaissance d'étude spécialement dédiée à l'évaluation du SiN comme substrat de culture pour des neurones primaires d'hippocampe, plusieurs études reportent l'utilisation de cellules neuronales issues de lignées sur ce matériaux [232][233][234].

De plus, certaines puces à microélectrodes (MEA, *microelectrode array*) très utilisées par les chercheurs en neurosciences pour sonder l'activité électrique des neurones *in vitro*, utilisent du nitrure de silicium comme matériaux pour isoler électriquement leurs électrodes et reportent l'utilisation de neurones primaires [235]. Toutes ces études reportent l'utilisation d'une fonctionnalisation classique par des polymères (PLL, PDL, laminine, etc.) pour favoriser l'adhésion des cellules au nitrure de silicium, et certaines reportent l'évaluation de nouvelles méthodes de fonctionnalisation du nitrure de silicium [236][237]. Tous ces éléments poussent à croire à l'évidence de la viabilité du SiN pour les cultures primaires de neurones.

Nous avons néanmoins vérifié dans le cadre de cette thèse la possibilité de maintenir nos neurones en vie et en bonne santé selon le protocole développé jusqu'à 14 jours en culture sur nos membranes de nitrure de silicium en effectuant un test de viabilité/cytotoxicité.

➤ Principe du test de viabilité

Pour effectuer ce test de viabilité nous avons utilisé le kit LIVE/DEAD Viability/cytotoxicity Assay de chez ThermoFischer. Le principe de la méthode consiste à utiliser deux marqueurs fluorescents, la calcéine AM (AcetoxyMethyl) et l'homodimère ethidium (EthD-1), émettant à deux couleurs différentes pour détecter simultanément les cellules mortes et vivantes d'une population de neurones.

Chacune de ces sondes mesure des paramètres reconnus comme marqueur de viabilité cellulaire, à savoir l'activité estérasique intracellulaire pour la calcéine AM et l'intégrité membranaire pour EthD-1. Les cellules vivantes se distinguent en effet par la présence d'une forte activité intracellulaire estérasique capable de convertir par réaction enzymatique la calcéine AM intrinsèquement non fluorescente ayant pénétré la cellule en calcéine, sonde intensément fluorescente. La calcéine produit une fluorescence verte intense dans les cellules vivantes, qui présente une longueur d'onde d'excitation à 495nm et réémet à 515nm.

La deuxième sonde EthD-1 pénètre les cellules qui ont une membrane endommagée, et émet dans le rouge en se liant aux acides nucléiques. L'EthD-1 a une longueur d'onde d'excitation à 485nm et réémet à 635nm. Ce marqueur ne pénètre pas les cellules vivantes présentant des membranes intactes. De cette façon le corps cellulaire de chaque cellule est marqué et on peut compter le nombre de cellules mortes (rouge) et de cellules vivantes (vert) en récoltant la lumière émise sur un microscope à fluorescence.

Le marquage se fait au jour voulu en ajoutant dans les puits de culture 1µM de calcéine AM et 4µM de EthD-1 dilué dans du PBS. Ces concentrations ont été déterminées au préalable sur des échantillons test comme étant les plus faibles possible fournissant une fluorescence suffisante. Des concentrations trop élevées de marqueurs fluorescents peuvent en effet endommager les cellules ou saturer l'observation. Les cultures sont ensuite incubées pendant 30 à 40 min avant observation.

➤ Résultats

Pour évaluer la viabilité de nos cultures sur nos membranes de nitrure de silicium nous avons marqué les neurones par cette méthode à différents stades de développement et nous avons comparé les résultats du dénombrement à ceux obtenus sur un substrat de référence, i.e. le verre.

Les résultats obtenus sont présentés ci-après, Figure 101. Des neurones primaires d'hippocampes ont été mis en culture selon le protocole décrit précédemment sur des membranes de nitrure de silicium obtenues selon le procédé décrit au chapitre 3 et sur des lames de verre. Les cultures sont contenues dans les réservoirs de PDMS circulaires de 5mm de diamètre. Les substrats ont été fonctionnalisés avec de la PDL/Laminine comme décrit également en amont. A chaque culture un lot de 9 échantillons de chaque type de substrat a été utilisé. 3 échantillons de chaque lot ont été marqués à chacun des 3 stades de développement testés : à l'ensemencement (DIV 0), après 7 jours de culture (DIV 7) et après 14 jours de culture (DIV 14), soit 9 membranes de nitrure de silicium et 9 lames de verres par campagne de culture.

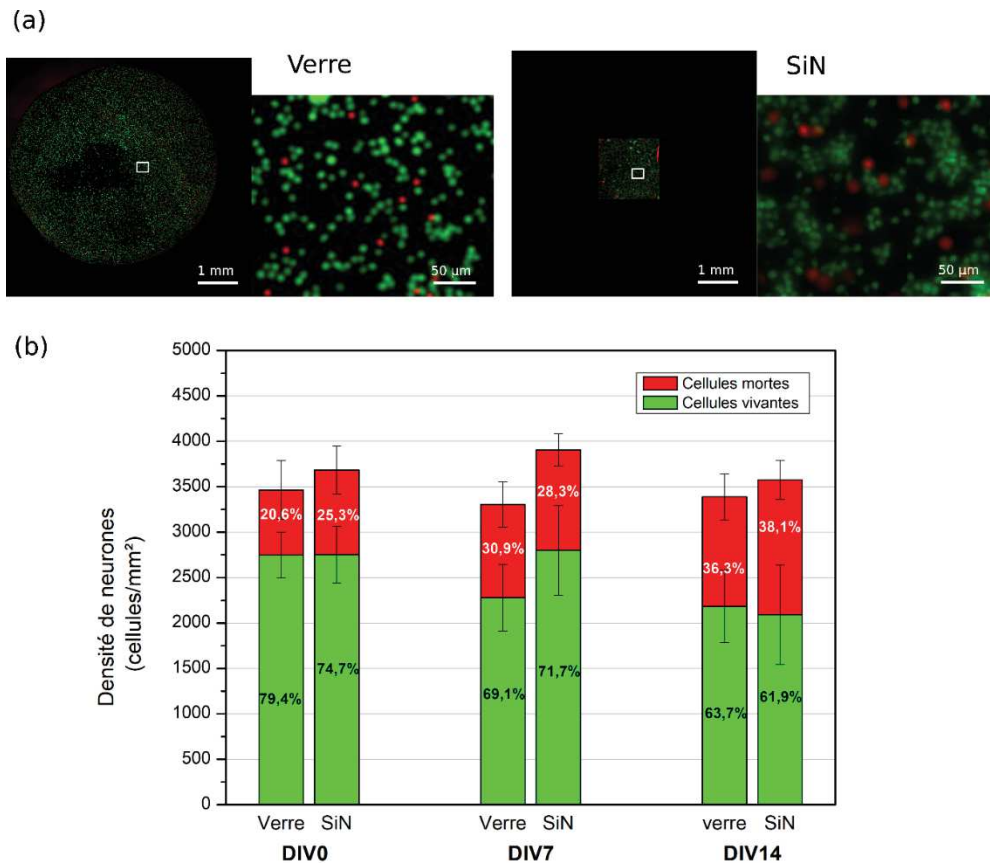


Figure 101 Viabilité des neurones primaires en culture in vitro sur les membranes de nitrure de silicium. (a) Images de microscopie de fluorescence représentatives d'une culture à DIV 0 sur nitrure de silicium et sur verre pour comparaison. Les cellules vivantes ont été marquées par de la calcéïne (vert) et les cellules mortes par EthD-1 (rouge). Les images de gauche montrent l'ensemble de la culture visible soit un puits de 5 mm de diamètre pour le verre, et l'ouverture de la membrane de 1,5x1,5mm² pour le nitrure de silicium. Les images de droite sont les agrandissements respectifs correspondants aux cadres blancs. (b) Densité de cellules vivantes et cellules mortes sur verre et sur nitrure de silicium à DIV0, DIV 7, et DIV 14. Les résultats ont été obtenus à partir de 3 échantillons de chaque substrat pour chaque stade de développement, et répliqués pour 4 cultures différentes. Les neurones ont étéensemencés à la même densité initiale de 3500 cellules/mm². Les résultats sont exprimés en terme de moyenne \pm erreur type à la moyenne (SEM, Standard Error of Mean).

Nous avons comparé les densités cellulaires sur verre et sur les membranes aux trois stades de développement clés, et ce pour 4 cultures différentes pour s'assurer de la répétabilité des résultats. Les neurones ont étéensemencés à la même densité initiale (3500 cellules/mm²), soit environ 70000 cellules par puits de culture en PDMS de 5 mm de diamètre.

Sur l'ensemble des populations étudiées, on note globalement une population de neurones légèrement plus dense sur les membranes de nitrure de silicium. En effet, si sur verre la densité totale de cellules comptées (mortes + vivantes) correspond bien à la densité initialementensemencée (on compte au total entre 3300 et 3500 cellules/mm² sur l'ensemble des lots sur verre), la densité totale de cellules sur les membranes de nitrure de silicium semble globalement plus élevée sur tous les échantillons (on compte en moyenne entre 3600cellules/mm² et 3900cellules/mm² sur l'ensemble des substrats de nitrure de silicium).

Des variations de la quantité de neurones déposés peuvent avoir lieu d'une culture à l'autre en raison des erreurs systématiques sur le comptage des cellules au moment de les resuspendre en solution après leur dissociation, ou au sein d'une même culture si la suspension de cellules n'est pas correctement homogénéisée avant de les prélever pour l'ensemencement d'un échantillon à l'autre. Cependant cette tendance se retrouve sur les 36 échantillons de SiN étudiés, aussi nous pensons que

la densité totale de cellules globalement plus élevée sur le nitrure est due à la configuration de l'échantillon lui-même. La membrane est au fond de la cavité creusée dans le silicium, ayant des parois inclinées à 54,7°. Il est probable que les neurones déposés sur les zones des parois glissent par sédimentation au fond de la cavité sur la membrane, augmentant localement la densité sur la zone observée. Les zones extérieures à la fenêtre carrée de la membrane étant opaques comme on peut le voir sur les images en fluorescence Figure 101 (a), il est par conséquent difficile de vérifier cette hypothèse. Nous considérons que la différence de densité cellulaire entre les échantillons de nitrure de silicium et le verre est suffisamment faible pour ne pas affecter le développement de la population de neurones, et que c'est bien l'influence du substrat dont il est question ici.

Notons par ailleurs que le dénombrement des cellules a été effectué grâce au logiciel Image J, sur toute la surface du puits de culture pour les lames de verre, (soit 19,63mm²), et sur la surface de la membrane pour le substrat de nitrure de silicium (soit 2,25mm²). Or comme on peut le voir sur les images par microscopie de fluorescence Figure 101(a), la répartition des neurones dans les puits de culture n'est pas toujours parfaitement homogène sur l'ensemble de la surface. On considère néanmoins que la zone sondée dans le cas des membranes est suffisamment grande pour présenter un nombre significatif de neurones. La réplication des échantillon sondés (36 fois) assure par ailleurs plus de fiabilité à cette étape de dénombrement.

Toutes les cellules ne s'attachent pas aux substrats et certaines cellules n'ont pas survécus à la dissociation ce qui explique que 20% en moyenne des neurones sont morts à DIV 0 sur le verre, et 25,3% sur le nitrure de silicium. Après 7 jours de culture in vitro la densité relative de cellules mortes augmente, elle passe de 20,6% à 30,9% sur le verre, et de 25,3 à 28,3% sur le nitrure de silicium. Si on compare les deux substrats à ce stade de développement, la proportion de cellules mortes par rapport aux cellules vivantes est tout à fait similaire et même très légèrement inférieure sur le nitrure de silicium. Cette fraction augmente pour les neurones après 14 jours de culture in vitro, où 38% de la population n'a pas survécu sur les membranes (vs 36,3% sur verre). Globalement, les neurones en croissance sur le nitrure de silicium semblent se développer de façon similaire aux neurones crus sur substrat de verre. Nous n'observons pas de mort de cellules significativement plus importante par rapport au verre, le substrat de référence.

Pour conclure définitivement sur la validation du nitrure de silicium comme substrat pour des cultures neuronales primaires, des études plus détaillées sur la croissance des cellules en regardant le nombre de neurites développées ou leur taille par exemple pourraient être menées. Le développement fonctionnel du réseau doit également être évalué, en sondant l'activité à différents stades caractéristiques de développement, par électrophysiologie ou imagerie calcique par exemple.

Conclusion de la partie 0

Dans cette partie nous avons présenté la mise en œuvre de l'aspect biologique de cette thèse : les cultures de neurones in vitro. L'objectif ultime du dispositif développé étant la visualisation de l'activité électrique de réseaux de neurones, l'interfaçage du dispositif avec les neurones biologiques avaient été anticipée et la culture cellulaire mise en œuvre dès le début du projet. Nous avons tout d'abord présenté la plateforme de culture cellulaire qui a été intégralement développée spécifiquement pour ce projet au sein du laboratoire. Les différentes étapes de la culture de neurones d'hippocampe de rat ont été détaillées, de l'extraction des embryons à l'ensemencement des cellules sur les substrats.

De nombreuses campagnes de cultures ont été nécessaires afin de mettre au point et d'optimiser le protocole à suivre. Les principaux paramètres influençant le maintien des cultures à long terme ont été successivement identifiés et optimisés pour aboutir progressivement à des cultures pérennes, viables et exploitables. La fonctionnalisation de surface et le contrôle précis de l'environnement des cellules comme le taux d'humidité se sont avérés être des paramètres déterminants pour la survie de nos cultures.

Une fois ces aspects maîtrisés, nous avons pu amorcer la première étape de validation du dispositif qui consiste à évaluer la compatibilité de l'élément du transducteur directement en contact avec les neurones : la membrane de nitrure de silicium. Un test de viabilité a été mené. Les résultats montrent que les neurones en croissance sur le nitrure de silicium semblent se développer de façon similaire aux neurones crus sur substrat de verre. Nous n'avons pas observé de mort de cellules significativement plus importante par rapport au verre, le substrat de référence. Des études plus poussées sur la croissance et le développement des cellules pourraient être envisagées pour conclure définitivement sur la validation du nitrure de silicium comme substrat pour des cultures primaires, en regardant le nombre ou la taille des neurites développées à différents stades caractéristiques de la culture par exemple. Néanmoins, ces premiers résultats montrent que le nitrure de silicium n'est pas cytotoxique, et que les réseaux de neurones pourront à terme être cultivés directement sur le dispositif.

Ce travail préliminaire de longue haleine était nécessaire pour envisager mener à bien la suite des étapes de validation du dispositif par les neurones biologiques.

Conclusion du chapitre 4

Ce chapitre était consacré au dispositif dans son ensemble et à toutes les avancées effectuées dans le cadre de cette thèse pour sa réalisation et sa caractérisation.

Après avoir mis au point la partie expérimentale autour de la transduction par les cristaux liquides dans le chapitre 2 et l'interface neurone /cristaux liquide au chapitre 3, la première partie de ce chapitre présente l'assemblage de ces différents éléments. En partant d'une cellule à cristaux liquides « basique », le dispositif final est obtenu en remplaçant le substrat supérieur de verre ITO par une membrane de nitrure de silicium autosupportée, confinant les cristaux liquides en une couche d'épaisseur homogène contrôlée par des espaceurs répartis aléatoirement. L'ensemble est surmonté d'un réservoir fluide simple destiné à contenir les neurones qui seront à terme cultivés directement sur la membrane de nitrure de silicium. Une deuxième électrode de verre recouverte d'ITO permet d'appliquer un champ électrique à travers l'ensemble de ce dispositif. Les surfaces en contact avec les cristaux liquide sont toutes les deux recouvertes d'une couche d'alignement, qui confère à la texture des cristaux liquides une structure en hélice tordue à 90°, propre au mode nématique torsadé. Un banc de caractérisation dédié a été mis au point et a permis de mener dans un premier temps des études optiques poussées, qui ont confirmé la structuration de la couche de cristaux liquides en hélice torsadée, et ont révélé que l'intégration de la membrane de nitrure de silicium n'altérait ni l'alignement, ni la transparence optique par rapport à la cellule à cristal liquide « basique ». Les études électro-optiques qui ont suivies ont permis de valider le comportement fonctionnel du dispositif, et ont confirmé sa capacité à traduire un champ électrique en variation d'intensité optique. Il en résulte d'une part que la gamme de fonctionnement est légèrement décalé vers des valeurs plus élevées de tension à cause d'une atténuation du champ électrique attribuée à la membrane couplée au milieu de culture, qui peut être aisément compensée par une intensification du champ électrique global de 1 à

2V seulement. D'autre part la sensibilité du dispositif n'est pas altérée et est conforme aux valeurs théoriques exposées dans le chapitre 2 pour le cristal liquide E7, dans une plage de fréquence de 100Hz à 10KHz, et quelle que soit l'épaisseur de la membrane de nitrure de silicium (pour les épaisseurs testées comprises entre 100 et 800nm). Les temps de réponse du dispositif n'ont pas pu être mesurés ici mais il serait intéressant de comparer les résultats à la théorie du chapitre 2 pour conclure définitivement sur les performances potentiellement adéquates du dispositif à la détection de signaux neuronaux.

Dans un second temps, nous avons cherché à obtenir la preuve du concept de la capacité de notre transducteur à détecter un signal électrique localisé de type activité neuronal. N'ayant pas forcément, à ce stade de l'étude, résolu tous les aléas relatifs aux cultures neuronales, nous nous sommes contentés d'évaluer la capacité du dispositif final à détecter une variation locale de champ électrique de faible intensité. Pour cela nous avons mis au point un outil de caractérisation microfluidique capable de mimer l'activité électrique d'un neurone et chercher à déterminer les caractéristiques de détection de notre dispositif. Nous avons présenté le concept général de cet outil microfluidique basé sur le confinement de flux chargé de créer un canal d'écoulement localisé au contact de la membrane. L'architecture générale a été présentée, suivie de simulations basées sur la méthode des éléments finis ayant permis d'optimiser la géométrie, le dimensionnement et les paramètres d'écoulement des fluides menant au meilleur confinement possible du canal représentant le neurone. Sur la base de ces simulations, la puce microfluidique a été réalisée, et les premiers tests visant à valider son fonctionnement entrepris. Le confinement du canal central au niveau de la jonction hydrodynamique a été obtenu avec succès et affiche une largeur minimale de 5,84 μm . En revanche, des développements supplémentaires seront nécessaires pour réussir à maintenir ce confinement jusqu'au fond du puits, en contact avec la membrane. Cette partie novatrice du circuit (la partie pyramidale) n'ayant pas fourni les résultats attendus prédits par les simulations. Des éléments et tests supplémentaires envisageables pour la suite de ce projet et susceptibles d'améliorer la performance de la puce microfluidique ont été suggérés et discutés. Ces étapes de perfectionnement supplémentaires devraient à terme permettre d'aboutir à une plateforme micro fluidique fonctionnelle, capable de simuler le comportement électrique localisé d'un neurone afin de déterminer les caractéristiques complètes de détection du dispositif électro-optique.

Enfin, une campagne d'interface du dispositif avec les neurones biologiques, visant à estimer la compatibilité biologique et la viabilité de ces neurones dans les dispositifs développés a été entamée. Une plateforme de culture cellulaire a été entièrement créée au cours de cette thèse. Le protocole de culture in vitro de neurone primaire d'hippocampe de rat a été mis u point et optimisé. Une étude de viabilité des cultures sur la membrane de nitrure de silicium a révélé la compatibilité de ce matériau pour les neurones, validant ainsi la première étape de l'intégration des neurones biologiques au dispositif.

Conclusion générale et perspectives

Les réseaux de neurones in-vitro permettent de modéliser les structures et les fonctions du cerveau humain observées par les neuroscientifiques. La complexité et la densité de ces réseaux nécessite des techniques d'observation de l'activité neuronale sur l'ensemble du réseau et à la résolution du neurone unique. Les techniques actuelles d'observation (*patch-clamp* ou *microélectrode array*) sont limitées soit par leur champs d'observation, soit par leur résolution. L'objectif de ces travaux de thèse était de lever ces limitations en développant une nouvelle technique capable d'enregistrer l'activité électrique neuronale à la résolution du neurone unique, et sur un large champ d'observation permettant de sonder des réseaux complexes (jusqu'à plusieurs milliers de neurones).

Pour cela, l'approche qui a été proposée consiste à interfacer les neurones en culture à un transducteur électro-optique novateur à base de cristaux liquides capable de convertir un champ électrique en variation d'intensité optique. Couplé à un capteur optique adapté, ce dispositif devrait permettre l'enregistrement de l'activité neuronale *in vitro* de manière non invasive (aucun marquage n'est requis), sur un grand champ d'observation et à la résolution du neurone unique.

La première partie de ce manuscrit présentait en détails les propriétés physiques singulières des cristaux liquides, cet état si particulier de la matière au cœur du principe de transduction électro-optique. Le principe même de fonctionnement de notre dispositif est inspiré des afficheurs à base de cristaux liquides. Aussi, nous avons expliqué comment les cristaux liquides étaient exploités dans des applications de visualisations selon différentes configurations en fonction de leurs propriétés. Le mode nématique torsadé que nous avons choisi d'exploiter pour notre transducteur a été particulièrement détaillé. Une étude théorique poussée a ensuite été conduite, présentant en détail le dispositif et la configuration expérimentale envisagée, puis confrontant directement les caractéristiques de la grandeur à mesurer (les signaux neuronaux) aux caractéristiques physiques du transducteur couplé à un capteur optique adapté. Cette étude a montré que les principales caractéristiques de détection du dispositif complet (transducteur électro-optique + capteur optique), à savoir sa gamme de mesure, sa sensibilité ainsi que sa dynamique de réponse étaient, en théorie, adaptées pour la détection de signaux neuronaux. Cette étude théorique a été complétée par un modèle basé sur la méthode des circuits électriques équivalents explicitant le comportement des différents éléments du dispositif et de leurs interactions mutuelles. Les simulations ont mis en valeur l'influence des paramètres physiques de l'interface neurone/ cristaux liquides, élément central du dispositif auquel a été consacré le chapitre 3. Sur la base de ces constatations préalablement favorables, une première étape de la fabrication du transducteur a été validée grâce au développement des techniques de fabrication permettant la structuration des cristaux liquides dans leur configuration finale. Ces étapes ont été mises au point par la fabrication intermédiaire d'une cellule à cristaux liquide « basique ». S'est alors posée à ce stade la question fondamentale de comment transmettre les signaux neuronaux à la couche structurée de cristaux liquides ?

La deuxième partie du manuscrit retrace toutes les pistes explorées potentiellement candidates pour incarner cette interface, que nous avons scindée en deux catégories. La première stratégie consistait à élaborer un matériau composé d'un ensemble d'éléments conducteurs répartis dans une matrice d'un matériau isolant. Différents matériaux ont été testés comme le PEDOT (un polymère conducteur) ou des nanofils de silicium. Plusieurs tests ont été menés pour d'une part assembler ce matériau

hybride, d'autre part le structurer sur une face avec les motifs d'alignement des cristaux liquides, et enfin le libérer sous forme membranaire pour pouvoir l'intégrer au reste du dispositif. Après avoir évalué la complexité et le temps de mise en œuvre de chacune de ces deux solutions, nous avons finalement conclu qu'aucune de ces approches n'était convenable pour un développement abouti à l'échelle d'un projet de thèse, et encore moins pour une intégration future dans un produit industriel. L'interface a finalement été fabriquée avec succès dans un matériau diélectrique uniforme, conformément à la deuxième stratégie. Une membrane mince de nitrure de silicium plane et autosupportée a en effet été fabriquée dans un premier temps grâce à des procédés de gravure conventionnels. Dans un deuxième temps nous avons développé un procédé de fabrication basé sur une technique d'ablation laser qui permet de paralléliser la production d'échantillons, avec une bonne reproductibilité et un temps de fabrication réduit par rapport à des procédés existants. Les membranes de SiN ainsi fabriquées répondent d'une part aux contraintes morphologiques initialement définies : nous obtenons une membrane bien plane et structurée en face avant pour l'alignement des cristaux liquides. D'autre part nous avons montré qu'à la longueur d'onde de travail (550nm) les membranes structurées transmettent 75 à 85% de la lumière incidente.

A ce stade des travaux, la partie active du transducteur convertissant les signaux électriques en variations d'intensité optique est technologiquement maîtrisée, et la couche interface séparant les neurones des cristaux liquides a été fabriquée avec succès. Le dernier chapitre du manuscrit a donc été consacré à l'élaboration du transducteur final par assemblage des différents éléments, puis à toutes les avancées visant à caractériser son fonctionnement et ses propriétés de détection.

Dans un premier temps, les étapes de fabrication du dispositif ont été détaillées et un banc de caractérisation dédié a été mis au point. Tout d'abord, des études optiques ont confirmé la structuration de la couche de cristaux liquides en hélice torsadée, et ont révélé que l'intégration de la membrane de nitrure de silicium n'altérait ni l'alignement, ni la transparence optique de l'empilement total. Les études électro-optiques qui ont suivies ont permis de valider le comportement fonctionnel du dispositif et ont confirmé sa capacité à traduire un champ électrique en variation d'intensité optique. La gamme de mesure a été légèrement décalée vers des valeurs plus élevées de tension à cause d'une atténuation du champ électrique attribuée à la membrane couplée au milieu de culture, mais peut être aisément compensée par une intensification du champ électrique global de 1 à 2V seulement. La sensibilité du dispositif quant à elle n'est pas altérée et est conforme aux valeurs théoriques exposées dans le chapitre 2 pour le cristal liquide E7, dans une plage de fréquence de 100Hz à 10KHz, et quelle que soit l'épaisseur de la membrane de nitrure de silicium (pour les épaisseurs testées comprises entre 100 et 800nm). Les temps de réponse du dispositif n'ont pas pu être mesurés ici mais il serait intéressant de comparer les résultats à la théorie du chapitre 2 pour conclure définitivement sur les performances potentiellement adéquates du dispositif à la détection de signaux neuronaux.

Dans un second temps, nous avons cherché à obtenir la preuve du concept de la capacité de notre transducteur à détecter une variation locale de champ électrique de type activité neuronale. Pour cela nous avons mis au point un outil de caractérisation microfluidique capable de mimer l'activité électrique d'un neurone et cherché à déterminer les caractéristiques de détection de notre dispositif. Nous avons présenté le concept général de cet outil microfluidique basé sur le confinement hydrodynamique de flux chargé de créer un canal d'écoulement localisé au contact de la membrane. L'architecture générale a été présentée, suivie de simulations basées sur la méthode des éléments finis

ayant permis d'optimiser la géométrie, le dimensionnement et les paramètres d'écoulement des fluides menant au meilleur confinement possible du canal représentant le neurone. Sur la base de ces simulations, la puce microfluidique a été réalisée, et les premiers tests visant à valider son fonctionnement entrepris. Le confinement du canal central au niveau de la jonction hydrodynamique a été obtenu avec succès et affiche une largeur minimale de 5,84 μm . En revanche, des développements supplémentaires seront nécessaires pour réussir à maintenir ce confinement jusqu'au fond du puits, en contact avec la membrane. Cette partie novatrice du circuit (la partie pyramidale) n'ayant pas fourni les résultats attendus prédits par les simulations. Des éléments et tests supplémentaires envisageables pour la suite de ce projet et susceptibles d'améliorer la performance de la puce microfluidique ont été suggérés et discutés. Ces étapes de perfectionnement supplémentaires devraient à terme permettre d'aboutir à une plateforme micro fluidique fonctionnelle, capable de simuler le comportement électrique localisé d'un neurone afin de déterminer les caractéristiques complètes de détection du dispositif électro-optique.

En parallèle du développement de cet outil de caractérisation indépendant, nous avons mis au point toute la plateforme de culture cellulaire pour aborder l'aspect biologique de ces travaux. Un protocole de culture in vitro de neurones primaires d'hippocampe de rat a été entièrement développé, de l'extraction des embryons au maintien des cultures à long terme. Ce travail a demandé beaucoup de mise au point et d'optimisation, mais a permis d'aboutir, avec l'aide du GIN, aux premières étapes de l'interfaçage des neurones au dispositif. Une étude visant à éprouver la viabilité du nitrure de silicium pour les cultures de neurones a été menée, révélant la comptabilité de ce matériau et validant ainsi la première étape de l'intégration des neurones biologiques au dispositif.

Pour résumer, nous avons imaginé, étudié puis fabriqué un premier prototype de transducteur électro-optique à base de cristaux liquides destiné à la détection de l'activité neuronale in vitro. Ce travail expérimental exploratoire et hautement pluridisciplinaire a permis de valider un certain nombre d'étapes dans le développement du dispositif :

- **Étude théorique couplée à un modèle analytique**
- **Développement et fabrication d'un prototype complet susceptible de fonctionner aussi bien avec une vraie culture neuronale qu'avec une cellule microfluidique susceptible de mimer les signaux neuronaux**
- **Validation des caractéristiques suivantes :**
 - **Effet électro-optique : traduction d'un champ électrique en variation d'intensité optique**
 - **Gamme de mesure**
 - **Sensibilité**
 - **Transparence**
 - **Biocompatibilité**

Ces premiers résultats ouvrent la voie à une nouvelle technologie permettant d'accéder à la structure fonctionnelle de réseaux de neurones. Complétés avec les tâches décrites en perspectives ci-après, nous croyons au fort potentiel de cette technique, capable à terme de contribuer au progrès de la recherche en neuroscience.

Les étapes clés restantes pour la validation complète du dispositif, son implémentation et son perfectionnement sont détaillées ci-après.

➤ Caractéristiques intrinsèques générales : Dynamique de réponse

Deux paramètres essentiels du transducteur ont déjà été déterminés, i.e. sa gamme de mesure et sa sensibilité. Il reste un dernier paramètre important pour valider les caractéristiques intrinsèques de dispositif : **le temps de réponse**. Pour cela, on pourrait utiliser un banc d'optique similaire à celui développé dans ces travaux sur lequel on viendrait fixer en sortie une photodiode comme module de détection optique dont les temps de réponse très rapides restent inférieurs à ceux des cristaux liquides (de l'ordre de la μs). Ce montage devrait permettre de mesurer les temps de réponse en montée et en descente et vérifier qu'ils sont bien adaptés à la détection de signaux de type neuronal.

➤ Caractéristiques de détection sans les neurones biologiques

Toujours dans la perspective de déterminer la capacité du dispositif à détecter des signaux de types neuronaux, et indépendamment des neurones biologiques, l'outil micro fluidique dont le développement a été entamé dans ces travaux de thèse devrait permettre de progresser dans la caractérisation du dispositif. Pour cela certaines tâches sont à approfondir :

- Finir **l'outil de caractérisation**. Il suffirait en effet de quelques améliorations et tests supplémentaires pour confirmer le bon fonctionnement de la puce micro fluidique développée. Le confinement fluidique visé a déjà été validé au niveau de la jonction hydrodynamique, une diminution de la rugosité des flancs du socle de PDMS sur lequel le circuit a été testé devrait permettre de déterminer les paramètres d'écoulement optimaux menant à un confinement du fluide de l'ordre de $10\mu\text{m}$. Une fois le confinement obtenu, le circuit pourra être interfacé à la membrane du dispositif, et les tests fonctionnels pourront être réalisés.
- Une fois l'outil microfluidique validé, une batterie de tests pourra être menée en appliquant dans le canal confiné un signal électrique de type signal neuronal. Cette étape incarnerait la **preuve du concept**, c'est à dire la capacité du dispo à détecter une variation locale de champ électrique d'une amplitude similaire à celle d'un potentiel d'action extracellulaire ($\sim 100\mu\text{V}$) Elle devrait également permettre de déterminer les performances de détection, comme le **rapport signal sur bruit, la résolution spatiale ou temporelle**.
- Faire varier la largeur du canal fluidique confiné pourrait nous permettre de **déterminer la performance de résolution spatiale** du dispositif, dans la limite atteignable par l'outil micro fluidique. Cela pourrait par exemple nous renseigner sur l'éventuelle habilité du dispositif à aller en deçà de la résolution du neurone unique ($10\mu\text{m}$), en détectant par exemple l'activité le long des neurites ($1\mu\text{m}$) ou encore au-delà, i.e. au niveau de la synapse (10 à 100nm).

➤ Caractérisations et validation avec les neurones biologiques

Sur des cultures de neurones primaires, suffisante en faible quantité pour le moment, les tests suivants devront être menés :

- La première étape concernant l'aspect biologique serait de valider la physiologie du signal détecté, en effectuant la mesure simultanément avec une technique existante, comme l'imagerie calcique ou le *patch clamp*. Cette étape aurait pour but de vérifier la nature physiologique du signal détecté, en mesurant l'activité spontanée des neurones en culture, ou

éventuellement en induisant cette activité par des stimulations extérieures (avec une technique d'optogénétique par exemple). Une calibration de la mesure par le dispositif pourrait être envisagée afin de distinguer les contributions des signaux enregistrés (potentiels d'action, activité d'un neurone unique ou d'un agrégat (LFP), agrégat de neurites, signal post ou pré synaptique, etc.).

- D'autre part, il serait intéressant d'interfacer une tranche de cerveau directement sur le dispositif afin de déterminer la profondeur de tissu à laquelle ce dernier est sensible.

Ces étapes supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la capacité et les performances de détection du dispositif créé. Elles permettraient de valider l'ensemble du concept proposé ici.

➤ Optimisation des performances du dispositif et implémentation de la plateforme d'observation

Pour aller plus loin, il faudrait implémenter le dispositif afin d'optimiser ses performances et systématiser son utilisation.

- Optimisation des performances du transducteur : des cristaux liquides avec des propriétés adaptées, voire conçues spécialement, pourraient remplacer les cristaux liquides utilisés au laboratoire. Par ailleurs il existe aujourd'hui des modes d'affichage (autre que le nématique torsadé utilisé ici) en cours de développement pour l'industrie des afficheurs dont on pourrait tirer parti pour améliorer notre transducteur. Pour cela, des modélisations plus poussées pourraient être envisagées. Nous avons commencé une collaboration dans ce sens avec le laboratoire LVE du Département DOPT du CEA Grenoble, qui dispose d'un logiciel spécialisé dans les applications des cristaux liquides et pourrait aider à déterminer la meilleure configuration ou le meilleur cristal liquide à utiliser. L'utilisation de ce logiciel pourrait venir compléter la partie théorique de modélisation menée dans ces travaux de thèse.
- Dans l'optique de l'utilisation visée par les neuroscientifiques, il faudrait envisager d'augmenter la surface de détection, en agrandissant la membrane de nitrure de silicium. Des résultats prometteurs ont déjà été obtenus en ce sens. Nous avons en effet réussi à libérer des membranes circulaires de nitrure de silicium de 800nm d'épaisseur atteignant 8mm de diamètre. Ces membranes sont néanmoins fragiles, et rendent l'utilisation du dispositif délicat. Il faudrait pour compenser cette fragilité développer une structure maintenant la membrane et l'épaisseur de cristaux liquide, qui n'affecte pas démesurément la transparence du dispositif. En revanche, nous arrivons à fabriquer sans casses significatives des dispositifs avec des membranes de 6mm de diamètres. Cela correspond à la taille du globe représenté sur une pièce de 1 centime d'euro, ou encore à la surface d'un puits de culture d'une plaque de 48 multipuits. Cette version améliorée devrait permettre l'enregistrement de l'activité de réseau entier de neurones, en répondant ainsi à l'objectif initial.
- Enfin, le dispositif devra être interfacé à son capteur CMOS approprié, permettant une visualisation du réseau entier de neurone. Cette étape a fait l'objet d'une thèse initiée en parallèle de ce projet. Un module complet de visualisation est en cours de développement, et devra permettre à terme de disposer du dispositif dans un environnement contrôlé en

température et en humidité de type incubateur, capable de suivre l'activité du réseau complet de neurones tout au long de son développement.

Bibliographie

- [1] E. R. Kandel, *Principles of neural science*. .
- [2] G. Bugnicourt, "Adhésion, croissance et polarisation de neurones sur substrats micro-et nano-structurés," <http://www.theses.fr>, Dec. 2011.
- [3] N. Burgess, M. Recce, and J. O'Keefe, "A model of hippocampal function," *Neural Networks*, vol. 7, no. 6–7, pp. 1065–1081, Jan. 1994.
- [4] V. I. Kryukov, "The role of the hippocampus in long-term memory: is it memory store or comparator?," *J. Integr. Neurosci.*, vol. 7, no. 1, pp. 117–84, Mar. 2008.
- [5] R. C. O'Reilly and J. W. Rudy, "Conjunctive representations in learning and memory: principles of cortical and hippocampal function.," *Psychol. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 311–45, Apr. 2001.
- [6] K. Jin *et al.*, "Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 1, pp. 343–347, Jan. 2004.
- [7] N. J. Allen and B. A. Barres, "Neuroscience: Glia — more than just brain glue," *Nature*, vol. 457, no. 7230, pp. 675–677, Feb. 2009.
- [8] K.-A. Nave, "Myelination and support of axonal integrity by glia," *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 244–252, Nov. 2010.
- [9] B. A. Barres, "The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease," *Neuron*, vol. 60, no. 3, pp. 430–440, Nov. 2008.
- [10] F. Veliev, "Interfacing neurons with nanoelectronics : from silicon nanowires to carbon devices," Jan. 2016.
- [11] R. Schätzthauer and P. Fromherz, "Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic currents," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 10, no. 6, pp. 1956–1962, Jun. 1998.
- [12] P. Fromherz, "Electrical Interfacing of Nerve Cells and Semiconductor Chips," *ChemPhysChem*, vol. 3, no. 3, p. 276, Mar. 2002.
- [13] B. P. Bean, "The action potential in mammalian central neurons," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, no. 6, pp. 451–465, Jun. 2007.
- [14] M. Voelker and P. Fromherz, "Signal Transmission from Individual Mammalian Nerve Cell to Field-Effect Transistor," *Small*, vol. 1, no. 2, pp. 206–210, Feb. 2005.
- [15] G. Buzsáki, C. A. Anastassiou, and C. Koch, "The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 13, no. 6, pp. 407–420, Jun. 2012.
- [16] I. Cohen and R. Miles, "Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in in vitro hippocampus.," *J. Physiol.*, vol. 524 Pt 2, pp. 485–502, Apr. 2000.
- [17] P. Fattahi, G. Yang, G. Kim, and M. R. Abidian, "A Review of Organic and Inorganic Biomaterials for Neural Interfaces," *Adv. Mater.*, vol. 26, no. 12, pp. 1846–1885, Mar. 2014.
- [18] A. B. Schwartz, X. T. Cui, D. J. Weber, and D. W. Moran, "Brain-Controlled Interfaces: Movement Restoration with Neural Prosthetics," *Neuron*, vol. 52, no. 1, pp. 205–220, Oct. 2006.

- [19] E. Fernández *et al.*, “Acute human brain responses to intracortical microelectrode arrays: challenges and future prospects,” *Front. Neuroeng.*, vol. 7, p. 24, Jul. 2014.
- [20] J. P. Donoghue, “Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces,” 2002.
- [21] M. J. Aebbersold *et al.*, “‘Brains on a chip’: Towards engineered neural networks,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 78, pp. 60–69, Apr. 2016.
- [22] A. Virlogeux *et al.*, “Reconstituting Corticostriatal Network on-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington’s Disease,” *Cell Rep.*, vol. 22, no. 1, pp. 110–122, Jan. 2018.
- [23] M. Hasan, Y. Berdichevsky, M. F. Hasan, and Y. Berdichevsky, “Neural Circuits on a Chip,” *Micromachines*, vol. 7, no. 9, p. 157, Sep. 2016.
- [24] T. T. Kanagasabapathi *et al.*, “Functional connectivity and dynamics of cortical–thalamic networks co-cultured in a dual compartment device,” *J. Neural Eng.*, vol. 9, no. 3, p. 036010, Jun. 2012.
- [25] D. Poli, V. P. Pastore, and P. Massobrio, “Functional connectivity in in vitro neuronal assemblies,” *Front. Neural Circuits*, vol. 9, p. 57, 2015.
- [26] J. L. Butler and O. Paulsen, “Hippocampal network oscillations — recent insights from in vitro experiments,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 31, pp. 40–44, Apr. 2015.
- [27] M. E. Ruaro, P. Bonifazi, and V. Torre, “Toward the Neurocomputer: Image Processing and Pattern Recognition With Neuronal Cultures,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 52, no. 3, pp. 371–383, Mar. 2005.
- [28] B. Peruche, B. Ahlemeyer, H. Brungs, and J. Kriegstein, “Cultured neurons for testing antihypoxic drug effects,” *J. Pharmacol. Methods*, vol. 23, no. 1, pp. 63–77, Mar. 1990.
- [29] N. J. Bray, S. Kapur, and J. Price, “Investigating schizophrenia in a ‘dish’: possibilities, potential and limitations,” *World Psychiatry*, vol. 11, no. 3, pp. 153–5, Oct. 2012.
- [30] D. A. Sun, S. Sombati, and R. J. DeLorenzo, “Glutamate injury-induced epileptogenesis in hippocampal neurons: an in vitro model of stroke-induced ‘epilepsy’,” *Stroke*, vol. 32, no. 10, pp. 2344–50, Oct. 2001.
- [31] M. Wong, “Epilepsy in a dish: an in vitro model of epileptogenesis,” *Epilepsy Curr.*, vol. 11, no. 5, pp. 153–4, Sep. 2011.
- [32] C. M. Henstridge and T. L. Spires-Jones, “Modeling Alzheimer’s disease brains in vitro,” *Nat. Neurosci.*, vol. 21, no. 7, pp. 899–900, Jul. 2018.
- [33] T. B. Sherer *et al.*, “An in vitro model of Parkinson’s disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage,” *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 16, pp. 7006–15, Aug. 2002.
- [34] S. Ullo, T. R. Nieuwenhuis, D. Sona, A. Maccione, L. Berdondini, and V. Murino, “Functional connectivity estimation over large networks at cellular resolution based on electrophysiological recordings and structural prior,” *Front. Neuroanat.*, vol. 8, p. 137, Nov. 2014.
- [35] E. Marconi *et al.*, “Emergent Functional Properties of Neuronal Networks with Controlled Topology,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e34648, Apr. 2012.
- [36] B. C. Wheeler and G. J. Brewer, “Designing Neural Networks in Culture: Experiments are described for controlled growth, of nerve cells taken from rats, in predesigned geometrical

- patterns on laboratory culture dishes.," *Proc. IEEE. Inst. Electr. Electron. Eng.*, vol. 98, no. 3, pp. 398–406, Mar. 2010.
- [37] C. Tomba and C. Villard, "Brain cells and neuronal networks: Encounters with controlled microenvironments," *Microelectron. Eng.*, vol. 132, pp. 176–191, Jan. 2015.
- [38] D. Kleinfeld, K. H. Kahler, and P. E. Hockberger, "Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates.," *J. Neurosci.*, vol. 8, no. 11, pp. 4098–120, Nov. 1988.
- [39] D. W. Branch, J. M. Corey, J. A. Weyhenmeyer, G. J. Brewer, and B. C. Wheeler, "Microstamp patterns of biomolecules for high-resolution neuronal networks.," *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 36, no. 1, pp. 135–41, Jan. 1998.
- [40] S. Roth, G. Bugnicourt, M. Bisbal, S. Gory-Fauré, J. Brocard, and C. Villard, "Neuronal Architectures with Axo-dendritic Polarity above Silicon Nanowires," *Small*, vol. 8, no. 5, pp. 671–675, Mar. 2012.
- [41] J. Erickson, A. Tooker, Y.-C. Tai, and J. Pine, "Caged neuron MEA: A system for long-term investigation of cultured neural network connectivity," *J. Neurosci. Methods*, vol. 175, no. 1, pp. 1–16, Oct. 2008.
- [42] G. Zeck and P. Fromherz, "Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 18, pp. 10457–10462, Aug. 2001.
- [43] H. Hardelauf *et al.*, "High fidelity neuronal networks formed by plasma masking with a bilayer membrane: analysis of neurodegenerative and neuroprotective processes," *Lab Chip*, vol. 11, no. 16, p. 2763, Aug. 2011.
- [44] J. W. Park, H. J. Kim, M. W. Kang, and N. L. Jeon, "Advances in microfluidics-based experimental methods for neuroscience research," *Lab Chip*, vol. 13, no. 4, p. 509, Feb. 2013.
- [45] J.-M. Peyrin *et al.*, "Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers.," *Lab Chip*, vol. 11, pp. 3663–73, 2011.
- [46] ‡ Anne M. Taylor, ‡ Seog Woo Rhee, § Christina H. Tu, § David H. Cribbs, § and Carl W. Cotman, and ‡ Noo Li Jeon*, "Microfluidic Multicompartment Device for Neuroscience Research†," 2002.
- [47] J. Park, H. Koito, J. Li, and A. Han, "Microfluidic compartmentalized co-culture platform for CNS axon myelination research," *Biomed. Microdevices*, vol. 11, pp. 1145–1153, 2009.
- [48] A. K. Vogt, G. Wrobel, W. Meyer, W. Knoll, and A. Offenhäusser, "Synaptic plasticity in micropatterned neuronal networks," *Biomaterials*, vol. 26, no. 15, pp. 2549–2557, May 2005.
- [49] J. Erickson, A. Tooker, Y.-C. Tai, and J. Pine, "Caged neuron MEA: A system for long-term investigation of cultured neural network connectivity," *J. Neurosci. Methods*, vol. 175, no. 1, pp. 1–16, Oct. 2008.
- [50] R. Brette and A. Destexhe, *Handbook of neural activity measurement*. Cambridge University Press, 2012.
- [51] B. Sakmann and E. Neher, "Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 46, no. 1, pp. 455–472, Oct. 1984.
- [52] D. Ogden and P. Stanfield, "Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording."
- [53] S. Ozawa and M. Yuzaki, "Patch-clamp studies of chloride channels activated by gamma-

- aminobutyric acid in cultured hippocampal neurones of the rat," *Neurosci. Res.*, vol. 1, no. 5, pp. 275–293, Oct. 1984.
- [54] S. Veitinger, "The Patch-Clamp Technique." 09-Nov-2011.
- [55] F. Veliev *et al.*, "Sensing single ion channels in neuronal networks with graphene transistors."
- [56] N. Spruston and D. Johnston, "Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons," *J. Neurophysiol.*, vol. 67, no. 3, pp. 508–529, Mar. 1992.
- [57] M. J. Berridge, "Neuronal calcium signaling," *Neuron*, vol. 21, no. 1, pp. 13–26, Jul. 1998.
- [58] M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, "The versatility and universality of calcium signalling," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 11–21, Oct. 2000.
- [59] B. Lancaster, R. A. Nicoll, and D. J. Perkel, "Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture," *J. Neurosci.*, vol. 11, no. 1, pp. 23–30, Jan. 1991.
- [60] C. Grienberger and A. Konnerth, "Imaging calcium in neurons," *Neuron*, vol. 73, no. 5, pp. 862–85, Mar. 2012.
- [61] T. Belloir, "Réseaux de neurones sur biopuces à base de transistors à effet de champs : enregistrement simultané de l'activité calcique et électrique," 2014.
- [62] D. Smetters, A. Majewska, and R. Yuste, "Detecting Action Potentials in Neuronal Populations with Calcium Imaging," *Methods*, vol. 18, no. 2, pp. 215–221, Jun. 1999.
- [63] A. Miyawaki *et al.*, "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin," *Nature*, vol. 388, no. 6645, pp. 882–887, Aug. 1997.
- [64] Y. Nam and B. C. Wheeler, "In Vitro Microelectrode Array Technology and Neural Recordings," 2011.
- [65] K. Mathieson *et al.*, "Fabricating high-density microarrays for retinal recording," *Microelectron. Eng.*, vol. 67–68, pp. 520–527, Jun. 2003.
- [66] L. Berdondini *et al.*, "Active pixel sensor array for high spatio-temporal resolution electrophysiological recordings from single cell to large scale neuronal networks," *Lab Chip*, vol. 9, no. 18, p. 2644, Sep. 2009.
- [67] U. Frey, U. Egert, F. Heer, S. Hafizovic, and A. Hierlemann, "Microelectronic system for high-resolution mapping of extracellular electric fields applied to brain slices," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 7, pp. 2191–2198, Mar. 2009.
- [68] P. Wang and Q. Liu, *Biomedical Sensors and Measurement*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [69] H. Oka, K. Shimono, R. Ogawa, H. Sugihara, and M. Taketani, "A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice," *J. Neurosci. Methods*, vol. 93, no. 1, pp. 61–7, Oct. 1999.
- [70] M. E. Spira and A. Hai, "Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 2, pp. 83–94, Feb. 2013.
- [71] S. Ingebrandt, C.-K. Yeung, M. Krause, and A. Offenhausser, "Neuron-transistor coupling: interpretation of individual extracellular recorded signals," *Eur. Biophys. J.*, vol. 34, no. 2, pp. 144–154, Mar. 2005.

- [72] M. Voelker and P. Fromherz, "Signal Transmission from Individual Mammalian Nerve Cell to Field-Effect Transistor," *Small*, vol. 1, no. 2, pp. 206–210, Feb. 2005.
- [73] G. Wrobel *et al.*, "Transmission electron microscopy study of the cell-sensor interface.," *J. R. Soc. Interface*, vol. 5, no. 19, pp. 213–22, Feb. 2008.
- [74] B. Eversmann *et al.*, "A 128 x 128 cmos biosensor array for extracellular recording of neural activity," *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 38, no. 12, pp. 2306–2317, Dec. 2003.
- [75] P. Fromherz, A. Offenhäusser, T. Vetter, and J. Weis, "A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor.," *Science*, vol. 252, no. 5010, pp. 1290–3, May 1991.
- [76] D. Braun and P. Fromherz, "Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon," *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 65, no. 4–5, pp. 341–348, Oct. 1997.
- [77] A. A. Prinz and P. Fromherz, "Electrical synapses by guided growth of cultured neurons from the snail *Lymnaea stagnalis*," *Biol. Cybern.*, vol. 82, no. 4, pp. L1–L5, Mar. 2000.
- [78] A. Lambacher *et al.*, "Electrical imaging of neuronal activity by multi-transistor-array (MTA) recording at 7.8 μ m resolution," *Appl. Phys. A*, vol. 79, no. 7, pp. 1607–1611, Nov. 2004.
- [79] F. Patolsky *et al.*, "Detection, stimulation, and inhibition of neuronal signals with high-density nanowire transistor arrays.," *Science*, vol. 313, no. 5790, pp. 1100–4, Aug. 2006.
- [80] X. T. Vu, J. F. Eschermann, R. Stockmann, R. GhoshMoulick, A. Offenhäusser, and S. Ingebrandt, "Top-down processed silicon nanowire transistor arrays for biosensing," *Phys. status solidi*, vol. 206, no. 3, pp. 426–434, Mar. 2009.
- [81] V. Schmidt, J. V. Wittemann, S. Senz, and U. Gösele, "Silicon Nanowires: A Review on Aspects of their Growth and their Electrical Properties," *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 25–26, pp. 2681–2702, Jul. 2009.
- [82] L. H. Hess *et al.*, "Graphene Transistor Arrays for Recording Action Potentials from Electrogenic Cells," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 43, pp. 5045–5049, Nov. 2011.
- [83] M. Helmstaedter, "Cellular-resolution connectomics: challenges of dense neural circuit reconstruction," *Nat. Methods*, vol. 10, no. 6, pp. 501–7, 2013.
- [84] T. Wichmann and M. R. DeLong, "Functional and pathophysiological models of the basal ganglia," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 6, no. 6, pp. 751–8, Dec. 1996.
- [85] J. A. Castellano, *Liquid gold : the story of liquid crystal displays and the creation of an industry*. World Scientific, 2005.
- [86] H. Kawamoto, "The History of Liquid-Crystal Displays," 2002.
- [87] R. H. Chen, *Liquid crystal displays : fundamental physics and technology*. Wiley, 2011.
- [88] J. Glasser, "Cristaux liquides," *Tech. l'ingénieur*, 1990.
- [89] Merck, "Merck Performance Materials." [Online]. Available: http://www.merck-performance-materials.jp/ja/display/lc_materials/lc_phases/lc_phases.html.
- [90] S. M. Kelly and M. O'neill, "LIQUID CRYSTALS FOR ELECTRO-OPTIC APPLICATIONS," 2000.
- [91] D. Stoenescu, "Cristaux liquides Applications à la visualisation," *Tech. l'ingénieur*, 2012.
- [92] S. Pestov and V. Vill, "Liquid Crystals," in *Springer Handbook of Condensed Matter and Materials Data*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 941–977.

- [93] P. G. de Gennes and J. Prost, *The physics of liquid crystals*. Clarendon Press, 1993.
- [94] D. Demus, *Handbook of liquid crystals*. Wiley-VCH, 1998.
- [95] D.-K. Yang and S.-T. Wu, *Fundamentals of liquid crystal devices*. .
- [96] U. Finkenzeller, T. Geelhaar, G. Weber, and L. Pohl, "Liquid-crystalline reference compounds," *Liq. Cryst.*, vol. 5, no. 1, pp. 313–321, Jul. 1989.
- [97] E. Lueder, *Liquid crystal displays : addressing schemes and electro-optical effects*. Wiley, 2010.
- [98] U. Finkenzeller, T. Geelhaar, G. Weber, and L. Pohl, "Liquid-crystalline reference compounds," *Liq. Cryst.*, vol. 5, no. 1, pp. 313–321, Jul. 1989.
- [99] L. Pohl, R. Eidenschink, G. Krause, and D. Erdmann, "Physical properties of nematic phenylcyclohexanes, a new class of low melting liquid crystals with positive dielectric anisotropy," *Phys. Lett. A*, vol. 60, no. 5, pp. 421–423, Mar. 1977.
- [100] A. Scharkowski, H. Schmiedel, R. Stannarius, and E. Weißhuhn, "Elastic Constants of Nematic Phenylpyrimidines Determined by Two Different Methods," 1990.
- [101] W. H. De Jeu, W. A. P. Claassen, and A. M. J. Spruijt, "The Determination of the Elastic Constants of Nematic Liquid Crystals," *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 37, no. 1, pp. 269–280, Jan. 1976.
- [102] M. Decker *et al.*, "Electro-optical switching by liquid-crystal controlled metasurfaces," 2009.
- [103] M. Schadt and W. Helfrich, "VOLTAGE-DEPENDENT OPTICAL ACTIVITY OF A TWISTED NEMATIC LIQUID CRYSTAL," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 18, no. 4, pp. 127–128, Feb. 1971.
- [104] H. Aoyama, Y. Yamazaki, N. Matsuura, H. Mada, and S. Kobayashi, "Alignment of Liquid Crystals on the Stretched Polymer Films," *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 72, no. 4, pp. 127–132, Jan. 1981.
- [105] S. Ishihara, "How far has the molecular alignment of liquid crystals been elucidated?," *IEEE/OSA J. Disp. Technol.*, vol. 1, no. 1, pp. 30–40, 2005.
- [106] D. W. Berreman, "Solid Surface Shape and the Alignment of an Adjacent Nematic Liquid Crystal," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 28, no. 26, pp. 1683–1686, Jun. 1972.
- [107] C. H. Gooch and H. A. Tarry, "The optical properties of twisted nematic liquid crystal structures with twist angles ≤ 90 degrees," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 8, no. 13, pp. 1575–1584, Sep. 1975.
- [108] P. Joffre, "Etude des cristaux liquides et des dispositifs de visualisation Table des matières," 2006.
- [109] K. Tarumi, U. Finkenzeller, and B. Schuler, "Dynamic Behaviour of Twisted Nematic Liquid Crystals," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 31, no. Part 1, No. 9A, pp. 2829–2836, Sep. 1992.
- [110] J. Kumar, V. Manjuladevi, R. K. Gupta, and S. Kumar, "Fast response in TN liquid-crystal cells: effect of functionalised carbon nanotubes," *Liq. Cryst.*, vol. 43, no. 4, pp. 488–496, Mar. 2016.
- [111] P. Nayek and G. Li, "Superior electro-optic response in multiferroic bismuth ferrite nanoparticle doped nematic liquid crystal device," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 10845, Sep. 2015.
- [112] R. Chen, *Liquid crystal displays: fundamental physics and technology*. 2011.
- [113] M. Voelker and P. Fromherz, "Signal Transmission from Individual Mammalian Nerve Cell to Field-Effect Transistor," *Small*, vol. 1, no. 2, pp. 206–210, Feb. 2005.

- [114] C. Vaillier, T. Honegger, F. Kermarrec, X. Gidrol, and D. Peyrade, "Comprehensive Analysis of Human Cells Motion under an Irrotational AC Electric Field in an Electro-Microfluidic Chip," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e95231, Apr. 2014.
- [115] A. L. HODGKIN and A. F. HUXLEY, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.," *J. Physiol.*, vol. 117, no. 4, pp. 500–44, Aug. 1952.
- [116] B. Deng, "Conceptual circuit models of neurons," 2009.
- [117] J. Rinzel, "A Formal Classification of Bursting Mechanisms in Excitable Systems," Springer, Berlin, Heidelberg, 1987, pp. 267–281.
- [118] Rakowski and Kaya, "Electro-chemical modeling challenges of biological ion pumps," in *Electrical Performance of Electronic Packaging IWCE-04*, 2004, pp. 207–208.
- [119] P. Fromherz and A. Stett, "Silicon-Neuron Junction: Capacitive Stimulation of an Individual Neuron on a Silicon Chip," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 75, no. 8, pp. 1670–1673, Aug. 1995.
- [120] M. Fejtl, A. Stett, W. Nisch, K.-H. Boven, and A. Möller, "On Micro-Electrode Array Revival: Its Development, Sophistication of Recording, and Stimulation," in *Advances in Network Electrophysiology*, Springer US, 2006, pp. 24–37.
- [121] J.-H. Kim, G. Kang, Y. Nam, and Y.-K. Choi, "Surface-modified microelectrode array with flake nanostructure for neural recording and stimulation," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 8, p. 085303, Feb. 2010.
- [122] R. Weis, B. Müller, and P. Fromherz, "Neuron Adhesion on a Silicon Chip Probed by an Array of Field-Effect Transistors," 1996.
- [123] A. Cohen, J. Shappir, S. Yitzchaik, and M. E. Spira, "Reversible transition of extracellular field potential recordings to intracellular recordings of action potentials generated by neurons grown on transistors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 6, pp. 811–819, Jan. 2008.
- [124] A. Offenhäusser and W. Knoll, "Cell-transistor hybrid systems and their potential applications," *Trends Biotechnol.*, vol. 19, no. 2, pp. 62–66, Feb. 2001.
- [125] M. R. Costa, R. a C. Altafim, and a P. Mammana, "Electrical modeling of liquid crystal displays-LCDs," *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, vol. 13, no. July 2005, pp. 204–210, 2006.
- [126] M. Schadt, "LIQUID CRYSTAL MATERIALS AND LIQUID CRYSTAL DISPLAYS," 1997.
- [127] M. Watanabe, "Active Matrix Driving and Circuit Simulation," in *Features of Liquid Crystal Display Materials and Processes*, InTech, 2011.
- [128] R. Gleixner and P. Fromherz, "The extracellular electrical resistivity in cell adhesion.," *Biophys. J.*, vol. 90, no. 7, pp. 2600–11, Apr. 2006.
- [129] A. Hai, J. Shappir, and M. E. Spira, "Long-Term, Multisite, Parallel, In-Cell Recording and Stimulation by an Array of Extracellular Microelectrodes," *J. Neurophysiol.*, vol. 104, no. 1, pp. 559–568, Jul. 2010.
- [130] A. Hai and M. E. Spira, "On-chip electroporation, membrane repair dynamics and transient in-cell recordings by arrays of gold mushroom-shaped microelectrodes," *Lab Chip*, vol. 12, no. 16, p. 2865, Aug. 2012.
- [131] G. Rosaz, "Intégration 3D de nanofils Si et SiGe pour la réalisation de transistors verticaux à canal nanofil," 2012.

- [132] J. M. Geary, J. W. Goodby, A. R. Kmetz, and J. S. Patel, "The mechanism of polymer alignment of liquid-crystal materials," *J. Appl. Phys.*, vol. 62, no. 10, pp. 4100–4108, Nov. 1987.
- [133] T. Uchida, E. Lee, and T. Miyashita, "Molecular alignment of liquid crystal on rubbed polymer alignment layer (I): Quantitative evaluation of rubbing strength and anchoring strength," 1994.
- [134] S. Ishihara, H. Wakemoto, K. Nakazima, and Y. Matsuo, "The effect of rubbed polymer films on the liquid crystal alignment," *Liq. Cryst.*, vol. 4, no. 6, pp. 669–675, Jun. 1989.
- [135] D. W. Berreman, "Solid Surface Shape and the Alignment of an Adjacent Nematic Liquid Crystal," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 28, no. 26, pp. 1683–1686, Jun. 1972.
- [136] L. T. Creagh and A. R. Kmetz, "Mechanism of Surface Alignment in Nematic Liquid Crystals," *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 24, no. 1–2, pp. 59–68, Jan. 1973.
- [137] J. Hoogboom, T. Rasing, A. E. Rowan, and R. J. M. Nolte, "LCD alignment layers. Controlling nematic domain properties," *J. Mater. Chem.*, vol. 16, p. 1305, 2006.
- [138] K. Takatoh, *Alignment technologies and applications of liquid crystal devices*. Taylor & Francis, 2005.
- [139] M. Chrzanowski, "Photoalignment-an alternative aligning technique for Liquid Crystal Displays," *Manuf. ...*, vol. 48, no. 1, pp. 7–13, 2011.
- [140] Y.-F. Lin, M.-C. Tsou, and R.-P. Pan, "Alignment of Liquid Crystals by Ion Etched Grooved Glass Surfaces," 2005.
- [141] Y. Kawata, K. Takatoh, M. Hasegawa, and M. Sakamoto, "The alignment of nematic liquid crystals on photolithographic micro-groove patterns," *Liq. Cryst.*, vol. 16, no. 6, pp. 1027–1036, Jun. 1994.
- [142] J. S. Gwag, J. Yi, J. H. Kwon, M. Yoneya, and H. Yokoyama, "Alignment of a nematic liquid crystal on nano-grooved material," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 119, no. 1, pp. 325–329, Jan. 2011.
- [143] Y. Youngwoo, M. Nakata, A. R. Martin, and N. a. Clark, "Alignment of liquid crystals by topographically patterned polymer films prepared by nanoimprint lithography," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 90, pp. 23–25, 2007.
- [144] H. Takahashi, T. Sakamoto, and H. Okada, "Liquid crystal device with 50 nm nanogroove structure fabricated by nanoimprint lithography," *J. Appl. Phys.*, vol. 108, no. 11, p. 113529, Dec. 2010.
- [145] Y. J. Liu, W. W. Loh, E. S. P. Leong, T. S. Kustandi, X. W. Sun, and J. H. Teng, "Nanoimprinted ultrafine line and space nanogratings for liquid crystal alignment," *Nanotechnology*, vol. 23, p. 465302, 2012.
- [146] S. Siqing, H. Wu, and A. Takahara, "Molecular reorientation of polyimide film induced by thermal nanoimprint lithography and liquid crystals alignment on it," *Polymer (Guildf.)*, vol. 72, pp. 113–117, Aug. 2015.
- [147] J. M. Kim *et al.*, "Method for Mono-dispersed Large Spherical Particles of Silica for LCD Spacer," *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 492, no. October, p. 245/[609]-256/[620], 2008.
- [148] D. Cuypers, "Vertically aligned nematic liquid crystal microdisplays for projection applications," 2005.
- [149] A. N. Aleshin, "Polymer nanofibers and nanotubes: Charge transport and device applications," *Adv. Mater.*, vol. 18, pp. 17–27, 2006.

- [150] B. H. Kim *et al.*, "Characteristics and field emission of conducting poly (3,4-ethylenedioxythiophene) nanowires," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 83, no. JULY, pp. 539–541, 2003.
- [151] M. Granström, M. Berggren, and O. Inganäs, "Micrometer- and nanometer-sized polymeric light-emitting diodes," *Science*, vol. 267, no. 5203, pp. 1479–81, Mar. 1995.
- [152] L. Groenendaal, F. Jonas, D. Freitag, H. Pielartzik, and J. R. Reynolds, "Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and Its Derivatives: Past, Present, and Future," *Adv. Mater.*, vol. 12, no. 7, pp. 481–494, Apr. 2000.
- [153] J. Jang, M. Chang, and H. Yoon, "Chemical Sensors Based on Highly Conductive Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Nanorods," *Adv. Mater.*, vol. 17, no. 13, pp. 1616–1620, Jul. 2005.
- [154] H. Xie, S.-C. Luo, and H. Yu, "Electric-Field-Assisted Growth of Functionalized Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Nanowires for Label-Free Protein Detection," *Small*, vol. 5, no. 22, pp. 2611–2617, Nov. 2009.
- [155] M. R. Abidian and D. C. Martin, "Multifunctional Nanobiomaterials for Neural Interfaces," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 4, pp. 573–585, Feb. 2009.
- [156] M. R. Abidian, D.-H. Kim, and D. C. Martin, "Conducting-Polymer Nanotubes for Controlled Drug Release," *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 4, pp. 405–409, Feb. 2006.
- [157] O. P. P. Dimitriev, D. A. a. Grinko, Y. V. V. Noskov, N. A. a. Ogurtsov, and A. A. a. Pud, "PEDOT:PSS films-Effect of organic solvent additives and annealing on the film conductivity," *Synth. Met.*, vol. 159, no. 21–22, pp. 2237–2239, Nov. 2009.
- [158] R. P. Lubianez, S. Kirchmeyer, D. Gaiser, and H. C. Starck, "Advances in PEDOT:PSS Conductive Polymer Dispersions."
- [159] J. L. Duvail, Y. Long, S. Cuenot, Z. Chen, and C. Gu, "Tuning electrical properties of conjugated polymer nanowires with the diameter," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 90, no. 2007, p. 102114, 2007.
- [160] T. A. Skotheim and J. R. Reynolds, *Handbook of conducting polymers*. CRC, 2007.
- [161] O. Marconot, "Croissance confinée de nanofils / nanotubes métalliques : élaboration et intégration dans les cathodes," 2016.
- [162] B. Charlot, G. Sassine, A. Garraud, B. Sorli, A. Giani, and P. Combette, "Micropatterning PEDOT:PSS layers," *Microsyst. Technol.*, vol. 19, pp. 895–903, 2013.
- [163] S. Ouyang *et al.*, "Surface Patterning of PEDOT:PSS by Photolithography for Organic Electronic Devices," *J. Nanomater.*, vol. 2015, pp. 1–9, 2015.
- [164] W. Martienssen and H. Warlimont, *Springer handbook of condensed matter and materials data*. Springer, 2005.
- [165] M. E. Messing, K. Hillerich, J. Johansson, K. Deppert, and K. A. Dick, "The use of gold for fabrication of nanowire structures," *Gold Bull.*, vol. 42, no. 3, pp. 172–181, Sep. 2009.
- [166] S. Avertin, "Développement et caractérisation de procédés de gravure plasma de T.S.V (Through Silicon Via) pour l'Intégration Tridimensionnelle de Circuits Intégrés," 2012.
- [167] E. Latu-Romain *et al.*, "A generic approach for vertical integration of nanowires," *Nanotechnology*, vol. 19, p. 345304, 2008.
- [168] W. J. Zhang, I. Bello, and S. T. Lee, "Vertically Aligned p-Type Single-Crystalline GaN Nanorod Arrays on n-Type Si for Heterojunction," pp. 1–5, 2008.

- [169] a C. Chia and R. R. LaPierre, "Contact planarization of ensemble nanowires," *Nanotechnology*, vol. 22, p. 245304, 2011.
- [170] M. D. Kelzenberg *et al.*, "Enhanced absorption and carrier collection in Si wire arrays for photovoltaic applications.," *Nat. Mater.*, vol. 9, no. 3, pp. 239–44, 2010.
- [171] J. B. Fortin and T.-M. (Toh-M. Lu, *Chemical vapor deposition polymerization : the growth and properties of parylene thin films*. Kluwer Academic Publishers, 2004.
- [172] S. Takeuchi, D. Ziegler, Y. Yoshida, K. Mabuchi, and T. Suzuki, "Parylene flexible neural probes integrated with microfluidic channels," *Lab Chip*, vol. 5, no. 5, p. 519, Apr. 2005.
- [173] D. C. Rodger *et al.*, "Flexible parylene-based multielectrode array technology for high-density neural stimulation and recording," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 132, no. 2, pp. 449–460, Jun. 2008.
- [174] J. Jakabovič *et al.*, "Preparation and properties of thin parylene layers as the gate dielectrics for organic field effect transistors," *Microelectronics J.*, vol. 40, no. 3, pp. 595–597, Mar. 2009.
- [175] A. Kahouli *et al.*, "Structural and dielectric properties of parylene-VT4 thin films," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 143, no. 3, pp. 908–914, Feb. 2014.
- [176] P. Temple-Boyer, C. Rossi, E. Saint-Etienne, and E. Scheid, "Residual stress in low pressure chemical vapor deposition SiNx films deposited from silane and ammonia," *J. Vac. Sci. Technol.*, vol. A 16, no. 4, pp. 2003–2007, 1998.
- [177] J. G. E. Gardeniers, H. A. C. Tilmans, C. C. G. Visser, I. Introduction, and S. Si, "LPCVD silicon-rich silicon nitride films for applications in micromechanics , studied with statistical experimental design *," vol. 14, no. 5, pp. 2879–2892, 1996.
- [178] M. J. Madou, *Fundamentals of microfabrication : the science of miniaturization*. CRC Press, 2002.
- [179] D. F. Edwards, "Silicon (Si)," in *Handbook of Optical Constants of Solids*, 1997, pp. 547–569.
- [180] H. R. Philipp, "Silicon Nitride (Si₃N₄) (Noncrystalline)," in *Handbook of Optical Constants of Solids*, 1997, pp. 771–774.
- [181] O. Lecarme, "Propriétés optiques de colloïdes assemblés : plasmonique et confinement diélectrique," Dec. 2011.
- [182] J. Li, C.-H. Wen, S. Gauza, R. Lu, and S.-T. Wu, "Refractive Indices of Liquid Crystals for Display Applications," *J. Disp. Technol.*, vol. 1, no. 1, pp. 51–61, 2005.
- [183] "Polarizers - Polarizer - Polarizing Filters | Edmund Optics." [Online]. Available: <https://www.edmundoptics.eu/optics/polarizers/>.
- [184] Hye Yoon Park *et al.*, "Achieving Uniform Mixing in a Microfluidic Device: Hydrodynamic Focusing Prior to Mixing," 2006.
- [185] I. D. Johnston, M. B. McDonnell, C. K. L. Tan, D. K. McCluskey, M. J. Davies, and M. C. Tracey, "Dean flow focusing and separation of small microspheres within a narrow size range," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 17, no. 3, pp. 509–518, Sep. 2014.
- [186] A. Pierzchalski, A. Mittag, and A. Tárnok, "Introduction A: Recent Advances in Cytometry Instrumentation, Probes, and Methods: Review," *Methods Cell Biol.*, vol. 102, pp. 1–21, Jan. 2011.
- [187] S. Tripathi, Y. V. B. Varun Kumar, A. Prabhakar, S. S. Joshi, and A. Agrawal, "Performance study

- of microfluidic devices for blood plasma separation—a designer’s perspective,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 25, no. 8, p. 084004, Aug. 2015.
- [188] P. J. CROSLAND-TAYLOR, “A Device for Counting Small Particles suspended in a Fluid through a Tube,” *Nature*, vol. 171, no. 4340, pp. 37–38, Jan. 1953.
- [189] M. Frankowski *et al.*, “Microflow cytometers with integrated hydrodynamic focusing,” *Sensors (Basel)*, vol. 13, no. 4, pp. 4674–93, Apr. 2013.
- [190] N. D. Mehendale and D. Paul, “Hydrodynamic Flow Focusing for Microfluidic Cell Sorting Chip.”
- [191] T. P. Lagus and J. F. Edd, “A review of the theory, methods and recent applications of high-throughput single-cell droplet microfluidics,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 11, p. 114005, Mar. 2013.
- [192] L. O’Connell, “Characterization of a Novel Electro-Optical Transducer,” Grenoble, 2017.
- [193] J. C. Lötters, W. Olthuis, P. H. Veltink, and P. Bergveld, “The mechanical properties of the rubber elastic polymer polydimethylsiloxane for sensor applications,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 7, no. 3, pp. 145–147, Sep. 1997.
- [194] M. A. Verschuuren, “Verschuuren - Substrate Conformal Imprint Lithography for Nanophotonics,” *Thesis Utr. Univ.*, 2010.
- [195] Feng Hua *et al.*, “Polymer Imprint Lithography with Molecular-Scale Resolution,” 2004.
- [196] N. Mehendale and D. Paul, “Hydrodynamic flow focusing for microfluidic cell sorting chip.” 2014.
- [197] S. L. Anna, N. Bontoux, and H. A. Stone, “Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels.”
- [198] J.-M. Jin, *The finite element method in electromagnetics*. .
- [199] R. W. Lewis, P. Nithiarasu, and K. N. Seetharamu, *Fundamentals of the Finite Element Method for Heat and Fluid Flow*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.
- [200] I. Holland, “Fundamentals of the finite element method,” *Comput. Struct.*, vol. 4, no. 1, pp. 3–15, Jan. 1974.
- [201] J. Reddy, *Solutions Manual for an Introduction to the Finite Element Method*. 2017.
- [202] H. Versteeg and W. Malalasekera, *An introduction to computational fluid dynamics: the finite volume method*. 2007.
- [203] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*. Oxford University Press, 2008.
- [204] L. Jiang, W. Wang, Y. Chau, and S. Yao, “Controllable formation of aromatic nanoparticles in a three-dimensional hydrodynamic flow focusing microfluidic device,” *RSC Adv.*, vol. 3, no. 39, p. 17762, Sep. 2013.
- [205] S.-C. Lin, P.-W. Yen, C.-C. Peng, and Y.-C. Tung, “Single channel layer, single sheath-flow inlet microfluidic flow cytometer with three-dimensional hydrodynamic focusing,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 17, p. 3135, Sep. 2012.
- [206] G. Eluru, L. A. N. Julius, and S. S. Gorthi, “Single-layer microfluidic device to realize hydrodynamic 3D flow focusing,” *Lab Chip*, vol. 16, no. 21, pp. 4133–4141, 2016.
- [207] J. C. McDonald *et al.*, “Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane),”

- Electrophoresis*, vol. 21, no. 1, pp. 27–40, Jan. 2000.
- [208] P. Kim, K. Kwon, M. Park, S. Lee, S. Kim, and K. Suh, “Soft lithography for microfluidics: a review,” 2008.
- [209] N. Bhattacharjee, A. Urrios, S. Kang, and A. Folch, “The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics,” *Lab Chip*, vol. 16, no. 10, pp. 1720–1742, May 2016.
- [210] C. Chen, B. T. Mehl, A. S. Munshi, A. D. Townsend, D. M. Spence, and R. S. Martin, “3D-printed microfluidic devices: fabrication, advantages and limitations—a mini review,” *Anal. Methods*, vol. 8, no. 31, pp. 6005–6012, Aug. 2016.
- [211] J. B. Knight, A. Vishwanath, J. P. Brody, and R. H. Austin, “Hydrodynamic Focusing on a Silicon Chip: Mixing Nanoliters in Microseconds,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 80, no. 17, pp. 3863–3866, Apr. 1998.
- [212] T. Imasaka, H. Kadone, T. Ogawa, and N. Ishibashi, “Detection limit of fluorescein as determined by fluorometry with an esculin laser source,” *Anal. Chem.*, vol. 49, no. 4, pp. 667–668, Apr. 1977.
- [213] J. Gordon, S. Amini, and M. K. White, “General Overview of Neuronal Cell Culture,” in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1078, 2013, pp. 1–8.
- [214] B. Ellenbroek and J. Youn, “Rodent models in neuroscience research: is it a rat race?,” *Dis. Model. Mech.*, vol. 9, no. 10, pp. 1079–1087, Oct. 2016.
- [215] S. Kaech and G. Banker, “Culturing hippocampal neurons,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 5, pp. 2406–2415, Dec. 2006.
- [216] Y. Ikegaya, Y. Itsukaichi-Nishida, M. Ishihara, D. Tanaka, and N. Matsuki, “Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 microm.,” *Neuroscience*, vol. 97, no. 2, pp. 215–7, 2000.
- [217] J. W. Deitmer, “Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons,” *Respir. Physiol.*, vol. 129, no. 1–2, pp. 71–81, Dec. 2001.
- [218] K.-A. Nave and B. D. Trapp, “Axon-Glial Signaling and the Glial Support of Axon Function,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 31, no. 1, pp. 535–561, Jul. 2008.
- [219] F. W. Pfrieger, “Role of glia in synapse development.,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 12, no. 5, pp. 486–90, Oct. 2002.
- [220] E. M. Ullian, K. S. Christopherson, and B. A. Barres, “Role for glia in synaptogenesis,” *Glia*, vol. 47, no. 3, pp. 209–216, Aug. 2004.
- [221] G. Iaria, M. Petrides, A. Dagher, B. Pike, and V. D. Bohbot, “Cognitive strategies dependent on the hippocampus and caudate nucleus in human navigation: variability and change with practice.,” *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 13, pp. 5945–52, Jul. 2003.
- [222] R. G. Morris, P. Garrud, J. N. Rawlins, and J. O’Keefe, “Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions,” *Nature*, vol. 297, no. 5868, pp. 681–3, Jun. 1982.
- [223] M. J. West, P. D. Coleman, D. G. Flood, and J. C. Troncoso, “Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer’s disease.,” *Lancet (London, England)*, vol. 344, no. 8925, pp. 769–72, Sep. 1994.
- [224] R. Camicioli, M. M. Moore, A. Kinney, E. Corbridge, K. Glassberg, and J. A. Kaye, “Parkinson’s disease is associated with hippocampal atrophy,” *Mov. Disord.*, vol. 18, no. 7, pp. 784–790, Jul. 2003.

- [225] F. Begeti, L. C. Schwab, S. L. Mason, and R. A. Barker, "Hippocampal dysfunction defines disease onset in Huntington's disease," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 87, no. 9, pp. 975–981, Sep. 2016.
- [226] Y. Sun *et al.*, "Surface Coating as a Key Parameter in Engineering Neuronal Network Structures In Vitro."
- [227] M. . Lydon, T. . Minett, and B. . Tighe, "Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture," *Biomaterials*, vol. 6, no. 6, pp. 396–402, Nov. 1985.
- [228] F. O. Morin, Y. Takamura, and E. Tamiya, "Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, no. 2, pp. 131–143, Aug. 2005.
- [229] E. Biffi, A. Menegon, F. Piraino, A. Pedrocchi, G. B. Fiore, and M. Rasponi, "Validation of long-term primary neuronal cultures and network activity through the integration of reversibly bonded microbioreactors and MEA substrates," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 1, pp. 166–175, Jan. 2012.
- [230] M. Ichikawa, K. Muramoto, K. Kobayashi, M. Kawahara, and Y. Kuroda, "Formation and maturation of synapses in primary cultures of rat cerebral cortical cells: an electron microscopic study," *Neurosci. Res.*, vol. 16, no. 2, pp. 95–103, Feb. 1993.
- [231] R. Kue, A. Sohrabi, D. Nagle, C. Frondoza, and D. Hungerford, "Enhanced proliferation and osteocalcin production by human osteoblast-like MG63 cells on silicon nitride ceramic discs.," *Biomaterials*, vol. 20, no. 13, pp. 1195–201, Jul. 1999.
- [232] K. Rak *et al.*, "Growth behavior of cochlear nucleus neuronal cells on semiconductor substrates," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 97A, no. 2, pp. 158–166, May 2011.
- [233] J. J. Medina Benavente, H. Mogami, T. Sakurai, and K. Sawada, "Evaluation of Silicon Nitride as a Substrate for Culture of PC12 Cells: An Interfacial Model for Functional Studies in Neurons," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, p. e90189, Feb. 2014.
- [234] A. Neumann, T. Reske, M. Held, K. Jahnke, C. Ragoß, and H. R. Maier, "Comparative investigation of the biocompatibility of various silicon nitride ceramic qualities in vitro," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 15, no. 10, pp. 1135–1140, Oct. 2004.
- [235] B. C. Wheeler and Y. Nam, "In Vitro Microelectrode Array Technology and Neural Recordings," *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 39, no. 1, pp. 45–61, 2011.
- [236] B. Eversmann *et al.*, "A 128 × 128 CMOS bio-sensor array for extracellular recording of neural activity," in *2003 IEEE International Solid-State Circuits Conference, 2003. Digest of Technical Papers. ISSCC.*, vol. 1, pp. 222–489.
- [237] A. Mescola *et al.*, "Specific Neuron Placement on Gold and Silicon Nitride-Patterned Substrates through a Two-Step Functionalization Method," *Langmuir*, vol. 32, no. 25, pp. 6319–6327, Jun. 2016.

Résumé : Les réseaux de neurones in-vitro permettent de modéliser les structures et les fonctions observées dans le cerveau humain. Accéder à l'activité individuelle des neurones sur l'ensemble d'un réseau est un réel défi en neuroscience pour mieux comprendre la complexité des processus qui régissent la communication neuronale. Les techniques actuelles d'enregistrement in vitro (électrophysiologie, imagerie calcique ou encore Micro Electrode Array) souffrent d'un compromis systématique entre la résolution et la quantité de neurones détectables simultanément (i.e. le champ d'observation). L'objectif de cette thèse est de lever cette contrainte en développant une nouvelle technique d'enregistrement de l'activité neuronale in vitro. L'approche proposée consiste à interfacer les neurones en culture in vitro à un transducteur électro-optique novateur à base de cristaux liquides, capable de convertir les signaux électriques issus de l'activité neuronale en variation d'intensité optique. Couplé à un capteur imageur adapté (sans lentille de type CMOS, d'une surface de quelques cm² contenant plusieurs millions de pixels, avec une résolution subcellulaire de l'ordre du μm²), ce dispositif devrait permettre l'enregistrement de l'activité neuronale d'un réseau complexe (plusieurs millions de neurones) de manière non invasive (aucun marquage n'est requis), et à la résolution du neurone unique. Une étude théorique couplée à un modèle électrique équivalent a montré que les caractéristiques de détection du dispositif complet (transducteur + capteur optique) étaient en théorie adaptées pour la détection de signaux neuronaux. Un premier prototype a été entièrement élaboré et le procédé de fabrication détaillé. Des caractérisations optiques et électro-optiques ont été menées, validant le fonctionnement même du transducteur et sa fonction d'interrupteur optique variable électriquement contrôlé. Le développement d'un nouvel outil microfluidique chargé d'approfondir les caractérisations et d'évaluer la capacité du dispositif à détecter un champ électrique local équivalent à un signal neuronal a été entamée. La compatibilité du matériau en contact avec les neurones a été évaluée et validée.

Abstract: In vitro neural networks have proven great potential in neuroscience to provide minimalist yet relevant models to mimic the complexity of human brain circuits. Monitoring the activity of neurons in such systems both at large scale and at single cell resolution represents the main challenge in neuroscience to fully decipher the brain information processing. Current techniques are not suitable to monitor the activity of the entire network (because of the field of view limitations) and at a single cellular resolution. In this work, we introduce a new in vitro neural activity monitoring device. Our approach consists in coupling a neural culture with a liquid crystal-based electro optical transducer that will convert the electrical activity of neuronal network in an optical response for each individual neuron. Imaged by a lens-free technique, a CMOS detector that has a large field of view (~cm², up to several millions of pixels with current technologies) and a sub cellular resolution (~μm²), each individual neuron will be monitored by taking a picture of the entire network. The concept study of the transducer and its electrical model show suitable theoretical characteristics of the device for neuronal like signal detection. A first prototype was developed and its fabrication process was entirely detailed. Optical and electro-optical characterization were carried out, revealing the desired electrically controlled light valve effect. The development of a new microfluidic tool was initiated to fully characterize the device and assess its ability to detect local neuronal like spikes. The viability of neuron culture on the transducer material was proved.
